

Regulación de la viabilidad y el metabolismo cardiomiocitario por fármacos (aliskiren) y hormonas (chemerina) con capacidad de modular procesos inflamatorios



Diego Rodríguez Penas



Tesis Doctoral
2016





Universidade de Santiago de Compostela

Facultade de Medicina e Odontoloxía

Departamento de Medicina

Instituto de Investigacións Sanitarias de Santiago

Área de Inflamación

Laboratorio de Investigación en Cardiología Celular e Molecular

REGULACIÓN DE LA VIABILIDAD Y EL
METABOLISMO CARDIOMIOCITARIO POR
FÁRMACOS (ALISKIREN) Y HORMONAS
(CHEMERINA) CON CAPACIDAD DE MODULAR
PROCESOS INFLAMATORIOS

Tesis Doctoral

Diego Rodríguez Penas
2016



Doña María Francisca Lago Paz, Investigadora del SERGAS en el Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago, y Don José Ramón González Juanatey, Catedrático de Medicina en la Universidade de Santiago de Compostela y Jefe del Servicio de Cardiología de la Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN QUE:

La presente Tesis Doctoral titulada “Regulación de la viabilidad y el metabolismo cardiomiocitario por fármacos (aliskiren) y hormonas (chemerina) con capacidad de modular procesos inflamatorios”, ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Investigación en Cardiología Celular e Molecular del Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago (Departamento de Medicina de la Universidade de Santiago de Compostela), estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para que conste, se firma la presente autorización en Santiago de Compostela, Septiembre 2016.

Fdo: María Francisca Lago Paz

Fdo: José Ramón González Juanatey





ÍNDICE



INTRODUCCIÓN	1
1.- Enfermedad cardiovascular, obesidad e inflamación	3
2.- Inflamación y síndrome metabólico	8
3.- Inflamación y metabolismo cardiaco	10
ALISKIREN	15
1.- Aliskiren e inhibición del SRAA, tratamiento de la hipertensión arterial	17
2.- Hipertensión arterial	17
3.- Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)	20
3.1.- Función a nivel sistémico	20
3.2.- Componentes del SRAA	23
-Angiotensinógeno	23
-Renina	24
-Enzima convertidora de angiotensina (ECA)	26
-Angiotensina II	27
-Aldosterona	31
-Angiotensinógeno	23
3.3.- SRAA local	31
3.4.- SRAA, inflamación y síndrome metabólico	34
4.- Tratamiento de la hipertensión arterial	37
4.1.- Mecanismos de inhibición farmacológica del SRAA	39
4.2.- Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas en la inhibición	

ÍNDICE

del SRAA	40
5.- Inhibición directa de la renina: Aliskiren	42
5.1.- Propiedades farmacológicas y efecto antihipertensivo del aliskiren	42
5.2.- Efectos del aliskiren a nivel cardiovascular	45
5.3.- Aliskiren, síndrome metabólico e inflamación	47
OBJETIVOS ALISKIREN	49
MATERIAL Y MÉTODOS ALISKIREN	53
1.- Ética	55
2.- Cultivos celulares	55
2.1.- Cultivos de cardiomiocitos adultos humanos	55
2.2.- Cultivo de cardiomiocitos neonatales de rata	56
2.3.- Cultivo de cardiomiocitos auriculares adultos de ratón: línea celular HL-1	57
3.- Ensayo de actividad mitocondrial: MTT	58
4.- Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo	58
5.- Ensayo de captación de ácidos grasos: BODIPY®	59
6.- Inmunocitoquímica y microscopía confocal	60
7.- Array de expresión de genoma completo: GeneChip® Affymetrix®	62
8.- Extracción de ARN	63
9.- RT-qPCR	64
10.- Extracción de proteínas	65
11.- Cuantificación de proteínas	66

12.- Western blot	67
13.- Análisis estadístico	68
RESULTADOS ALISKIREN	71
1.- El tratamiento con aliskiren no afecta a la viabilidad o ciclo celular de células cardíacas en cultivo	73
2.- Efecto del aliskiren sobre la captación de ácidos grasos por cardiomiocitos neonatales de rata	74
3.- Efecto del tratamiento con aliskiren sobre la movilización de CD-36 y GLUT-4	75
4.- Efecto del aliskiren sobre la activación de ERK1/2 y sobre la expresión de los receptores (P)RR e Igf2/M6F	77
5.- Array de expresión de genoma completo de rata	80
6.- Efecto del aliskiren sobre la expresión de enzimas clave en el metabolismo lipídico y biosíntesis del colesterol en cardiomiocitos	84
DISCUSIÓN ALISKIREN	89
CONCLUSIONES ALISKIREN	103
CHEMERINA	105
1.- Tejido adiposo	109
1.1.- Tejido adiposo pardo	109
1.2.- Tejido adiposo blanco	109
2.- El tejido adiposo blanco como órgano endocrino	111
2.1.- Tejido adiposo visceral y subcutáneo	115

2.2.- Tejido adiposo eipcárdico y perivascular	116
3.- Adipokinas y sus efectos sobre el sistema cardiovascular	117
-Leptina	117
-Adiponectina	118
-Resistina	119
-Visfatina	119
-Apelina	120
-Omentina	120
-Grelina	121
-Nesfatina	121
4.- El corazón como órgano endocrino	122
5.- Chemerina, una nueva adipokina	123
5.1.- Descubrimiento de la chemerina: TIG-2/RARRES2	123
5.2.- Síntesis y estructura de la chemerina	124
5.3.- Regulación de la chemerina	125
5.3.1.- Regulación transcripcional en la actividad de la chemerina	125
- Regulación de la expresión de la chemerina por receptores nucleares	126
- Regulación de la expresión de la chemerina por factores metabólicos	128
- Regulación de la expresión de la chemerina por citoquinas	129

5.3.2.- Regulación postranscripcional en la actividad de la chemerina	130
- Secreción de la chemerina	130
- Expresión de la chemerina	130
- Procesamiento proteolítico	131
6.- Receptores de la chemerina	136
6.1.- CMKLR1	136
6.2.- GPR1	138
6.3.- CCRL2	139
7.- Funciones conocidas de la chemerina a nivel fisiológico	141
7.1.- La chemerina como agente quimiotáctico	142
7.2.- La chemerina como adipokina	143
7.3.- La chemerina y el síndrome metabólico	145
7.4.- La chemerina y el sistema cardiovascular	148
8.- Chemerina y procesos inflamatorios	151
OBJETIVOS CHEMERINA	155
MATERIAL Y MÉTODOS CHEMERINA	161
1.- Ética	163
2.- Tejidos humanos	163
3.- Animales	164
4.- Cultivos celulares	164

ÍNDICE

4.1.- Cultivos de cardiomiocitos adultos humanos	164
4.2.- Cultivo de cardiomiocitos neonatales de rata	164
4.3.- Cultivo de cardiomiocitos auriculares adultos de ratón: línea celular HL-1	166
5.- Tinción vital Hoechst 33258	164
6.- Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo	165
7.- Ensayo de captación de glucosa	166
8.- Extracción de ARN	167
9.- RT-qPCR	168
10.- Extracción de proteínas	169
11.- Cuantificación de proteínas	169
12.- Western blot	170
13.- ELISA de chemerina de rata	171
14.- Análisis estadístico	172
RESULTADOS CHEMERINA	173
1.- Expresión génica de chemerina y CMKLR1 en cardiomiocitos humanos y murinos	175
2.- Efectos de la chemerina sobre la viabilidad de los cardiomiocitos	178
2.1.- Tinción vital Hoechst 33258	178
2.2.- Ciclo celular	181
3.- Efecto de la chemerina sobre la captación de glucosa por cardiomiocitos murinos	184

4.- Efecto de la chemerina sobre la activación de AKT	185
5.- Efecto de la chemerina sobre la activación de la caspasa-9 en cardiomiocitos	188
6.- Regulación de los niveles de expresión de chemerina y CMKLR1 en cardiomiocitos neonatales de rata por la insulina	190
7.- Regulación de los niveles de expresión de chemerina y CMKLR1 en cardiomiocitos neonatales de rata por TNF- α	193
DISCUSIÓN CHEMERINA	197
CONCLUSIONES CHEMERINA	213
BIBLIOGRAFÍA	217
ANEXO	268







INTRODUCCIÓN



1.- Enfermedad cardiovascular, obesidad e inflamación

La asociación entre las enfermedades cardiovasculares, la obesidad y la inflamación es bien conocida, y aunque el mecanismo fisiopatológico todavía no está bien caracterizado, si existe una fuerte asociación de la obesidad e inflamación con una elevada morbilidad y mortalidad por patologías tales como la diabetes mellitus tipo II, enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares, aterosclerosis, hipertensión arterial, hiperlipemias, osteoartritis y algunos tipos de cáncer.^{1,2}

Aunque desde hace años han existido evidencias epidemiológicas de una relación entre obesidad e inflamación,³ no ha sido hasta hace poco que se estableció una vinculación fisiopatológica que demostrara que el aumento del tejido adiposo pudiese desencadenar en una situación de inflamación crónica.⁴ Esta inflamación crónica de bajo grado que acompaña a la obesidad se pone de manifiesto por el incremento de marcadores inflamatorios como la proteína C reactiva (PCR), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o la interleuquina 6 (IL-6) en la circulación de individuos obesos.⁵

A raíz de estos resultados, nuevos trabajos centrados en el estudio del tejido adiposo demostraron su capacidad para expresar y secretar una amplia variedad de citoquinas y quimioquinas, denominadas en su conjunto adipocitoquinas o adipokinas.⁶ De esta forma el tejido adiposo, considerado durante mucho tiempo como un mero almacén de energía, es reconocido ahora como un órgano endocrino más.⁷ Aunque el tejido adiposo se compone principalmente de adipocitos, es un tejido complejo y está conformado también por otros tipos celulares como preadipocitos, fibroblastos, macrófagos, linfocitos, células endoteliales y vasos sanguíneos, embebidos en una matriz.⁸

A medida que aumenta el tamaño del tejido adiposo, la hipertrofia de los adipocitos conlleva un aumento en la producción, por parte de los mismos y de otras células que forman parte del propio tejido, de adipokinas, quimioquinas y citoquinas proinflamatorias; es decir, se produce un desequilibrio en la producción de estas moléculas, aparece un cambio hacia un patrón proinflamatorio, aterogénico y diabético en la secreción de las adipokinas producidas, y este desequilibrio conduce a la aparición de la inflamación de bajo grado a nivel sistémico.⁹

A medida que se desarrolla la obesidad se producen cambios en el tejido adiposo en una transición hacia un fenotipo disfuncional: la secreción de proteínas proinflamatorias por células de propio tejido provocan un aumento en el número de macrófagos infiltrados, lo cual promueve un efecto de retroalimentación positiva que desencadena en el aumento progresivo de la inflamación que se vuelve sistémica y que se relaciona estrechamente con un aumento del riesgo de desarrollar diabetes de tipo 2, aterosclerosis y un amplio rango de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, el infarto y cardiopatía isquémica¹⁰ (Figura 1).

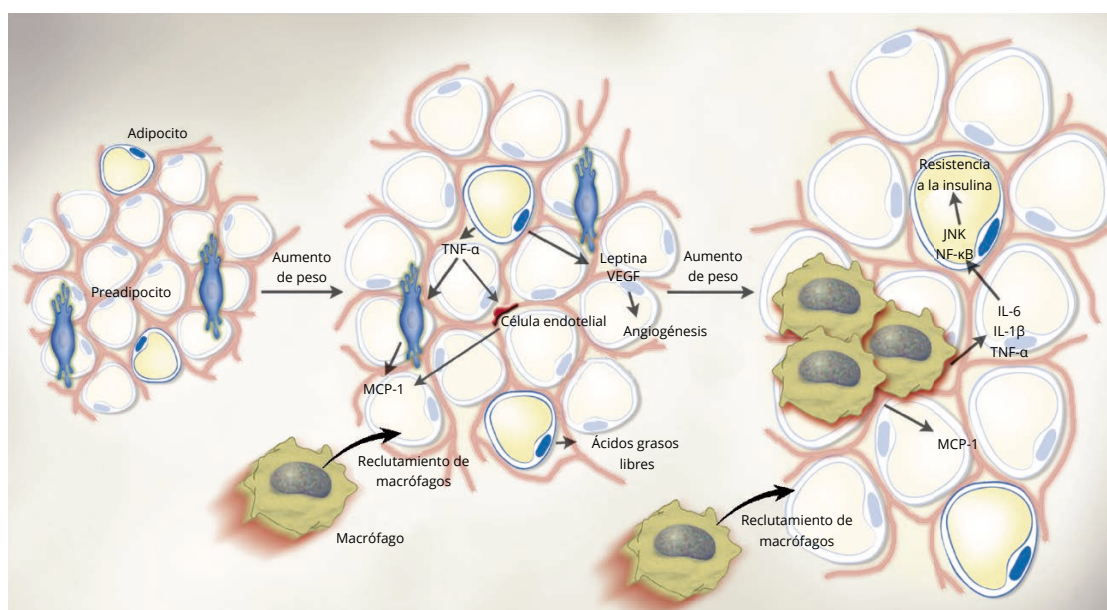


Figura 1. La función del tejido adiposo se encuentra alterada en la obesidad. A medida que aumenta la hipertrofia se produce una infiltración progresiva de macrófagos promovida por las células endoteliales y los propios adipocitos, cuya función endocrina se ve modificada y en los cuales se produce un desequilibrio en la producción y secreción de proteínas antiinflamatorias y proinflamatorias.⁴

El tejido adiposo no es un órgano homogéneo, posee heterogeneidad con respecto a su distribución anatómica, y los diferentes acúmulos adiposos presentan a su vez distintos perfiles en la secreción de adipokinas.¹¹ Así, las hormonas sintetizadas en el tejido adiposo visceral son secretadas a la circulación portal, con lo que conlleva una influencia directa en los procesos metabólicos del hígado,¹² mientras que, las hormonas producidas en el tejido adiposo subcutáneo son secretadas a la circulación sistémica.¹³ Por su parte, la grasa epicárdica está asociada con inflamación y quimiotaxis, el tejido adiposo muscular está principalmente involucrado en la resistencia a la insulina; el localizado a nivel renal afecta al volumen intravascular e hipertensión y el perivascular está implicado en la aterosclerosis e hipertensión¹⁴ (Figura 2).

Además, numerosos estudios han contribuido a poner en evidencia que el acúmulo regional de grasa es más importante a la hora de considerar el riesgo de enfermedades cardiovasculares que el exceso de adiposidad total de por sí.¹⁵

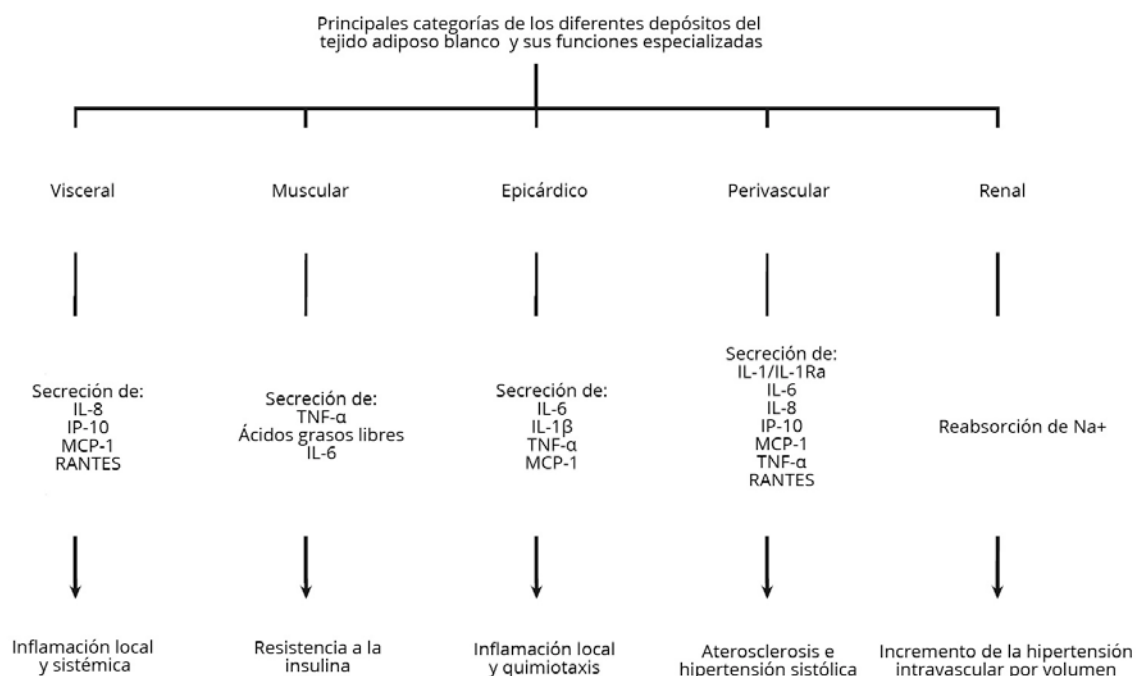


Figura 2. Categorías y funciones de los diferentes depósitos de tejido adiposo blanco en función de su localización anatómica y su implicación en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.¹¹

La ganancia de peso durante la edad adulta es un fuerte e independiente factor de riesgo de la muerte prematura, a pesar del nivel de actividad física.¹⁶ El incremento de la adiposidad y la reducción de la actividad física son buenos predictores independientes de cardiopatía isquémica¹⁷ y muerte:¹⁸ la mayoría de infartos se pueden predecir a través de la adiposidad abdominal y la actividad física y otros factores fácilmente medibles.¹⁷

El Índice de Masa Corporal (IMC) elevado se asocia con la aparición de factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, la dislipemia, la resistencia a la insulina y la diabetes;¹⁵ y en diferentes estudios se ha puesto de manifiesto que el IMC elevado también se encuentra asociado significativamente, en ambos sexos, con angina, infarto de miocardio insuficiencia cardiaca y muerte súbita.¹⁹

El aumento del tejido adiposo visceral en particular, con independencia del IMC, se asocia con la aparición de procesos patológicos de origen diabético y aterogénico como la resistencia a la insulina, elevación de los triglicéridos y de lipoproteínas de baja densidad (LDL) o disminución de los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL)¹⁵ (Figura 3).

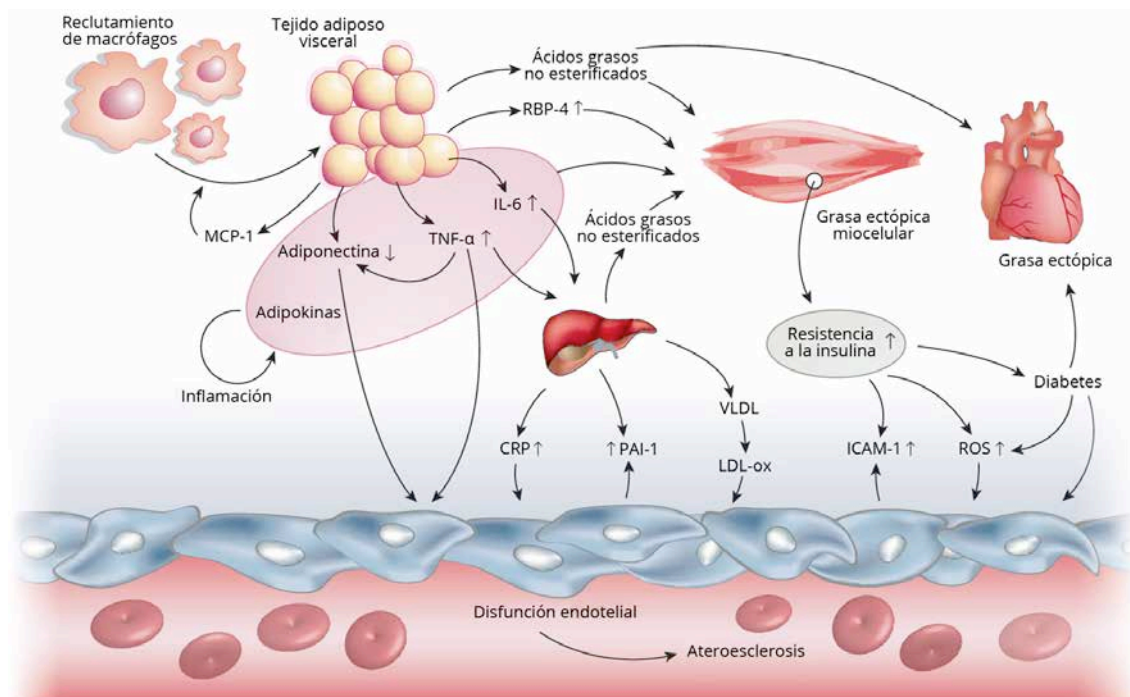


Figura 3. El acúmulo de tejido adiposo visceral y la resistencia a la insulina pueden contribuir al desarrollo de enfermedades cardiovasculares en la obesidad. La grasa visceral contribuye a la disfunción endotelial a través del efecto directo mediado por la secreción de adipocinas que, junto con la resistencia a la insulina y la dislipemia pueden conllevar a la aparición prematura de la aterosclerosis.²⁰

La acumulación crónica de grasa produce una serie de adaptaciones a nivel cardiovascular con el objetivo de mantener la homeostasis corporal.¹⁵ En pacientes obesos el gasto cardíaco se incrementa debido al aumento del volumen de sangre circulante que debe satisfacer las necesidades metabólicas en estos estados, y que a su vez incrementa el volumen de sangre que sale del ventrículo izquierdo en la contracción (volumen sistólico).¹⁵

A largo plazo, el aumento de volumen sanguíneo incrementa la tensión en la pared ventricular y conducirá a la aparición del remodelado cardíaco, que con el ensanchamiento de las cavidades y el aumento de la tensión en las paredes puede conducir al desarrollo de la hipertrofia ventricular.^{21,22}

La función sistólica permanece preservada al principio del desarrollo de la hipertrofia ventricular debido a que existe una adaptación al ensanchamiento de las cavidades ventriculares pero en los estadios más avanzados de hipertrofia la función sistólica se ve alterada.¹⁹ La hipertrofia ventricular, la degeneración a nivel muscular, el incremento del volumen sanguíneo y las disfunciones sistólica y diastólica son los principales precursores de la insuficiencia cardiaca en la obesidad.¹⁹ Adicionalmente, la existencia de diferentes comorbilidades asociadas con la obesidad pueden predisponer a los pacientes obesos a padecer insuficiencia cardiaca como son la hipertensión o la diabetes de tipo II.¹⁹

La combinación de la obesidad y la hipertensión tiene dos consecuencias importantes. En primer lugar, esta combinación es particularmente insidiosa debido a que la población con obesidad e hipertensión tienen una alta morbilidad y mortalidad por enfermedades cardiovasculares, incluyendo la enfermedad coronaria, insuficiencia cardiaca congestiva, la muerte súbita cardiaca, enfermedad renal crónica, enfermedad renal terminal y accidentes cerebrovasculares.²³ En segundo lugar, la obesidad aumenta el riesgo de desarrollar hipertensión arterial resistente al tratamiento por lo que estos pacientes requieren de uno o más fármacos antihipertensivos.²⁴

La obesidad también se asocia con un incremento en el consumo de oxígeno del miocardio, un incremento del metabolismo de los ácidos grasos y una reducción de la eficiencia del miocardio.²⁵ En estos casos la captación de ácidos grasos por el miocardio parece ser mayor que su oxidación, lo que contribuye a la acumulación lipídica en el miocardio.²⁶ La lipotoxicidad derivada de la acumulación de lípidos a nivel del miocardio está vinculada a cardiomiopatías en animales obesos²⁷ y también existen evidencias de defectos en la capacidad oxidativa mitocondrial, el desacoplamiento mitocondrial y el aumento de especies reactivas del oxígeno mitocondrial en estudios de ratones obesos transgénicos, lo que redunda en una utilización anormal de sustratos por parte del miocardio y contribuye a reducir la eficiencia cardiaca pudiendo resultar en alteraciones contráctiles en corazones obesos.²⁸

El impacto negativo de la obesidad en el metabolismo y la función cardiaca puede ser reversible con la reducción de peso. Existen estudios experimentales que han demostrado una atenuación en la hipertrofia del ventrículo izquierdo, una disminución

de la fibrosis y de la disfunción diastólica después de una reducción de peso mediante restricción calórica.²⁹ Los estudios clínicos también ha mostrado una mejora en los parámetros ecocardiográficos del remodelado ventricular izquierdo después de una reducción en el peso posterior a una intervención de cirugía bariátrica.³⁰

2.- Inflamación y síndrome metabólico

Se denomina síndrome metabólico a un conjunto de condiciones patológicas que involucran a la obesidad, la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa, la dislipemia, el hígado graso y la hipertensión, y que se utiliza como un predictor en la aparición de enfermedades cardiovasculares.^{31,32} La prevalencia del síndrome metabólico se ha incrementado drásticamente en los últimos años a nivel mundial y desempeña un papel crucial en la incidencia de la diabetes de tipo II y de diversas enfermedades cardiovasculares.^{33,34} Aunque existe controversia en cuanto a los criterios de diagnóstico del síndrome metabólico, han sido varios los comités científicos que han intentado definirlo y consensuar los requisitos para su diagnóstico. De forma oficial en 1999 la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso unos determinados criterios para la consideración del síndrome metabólico:³⁵

- *Obesidad central*: cociente de circunferencia abdomen/cadera ≥ 0.9 en varones y ≥ 0.85 en mujeres; IMC > 30 kg/m².
- *Hipertensión*: presión sanguínea $\geq 140/90$ mmHg.
- *Dislipemia*: triglicéridos ≥ 1.7 mmol/L; HDL < 0.9 mmol/L en varones y < 1.0 mmol/L en mujeres.
- *Hiper glucemia*: glucosa en ayunas ≥ 6.1 mmol/L.
- *Resistencia a la insulina*.

En los siguientes años otros comités continuaron redefiniendo el síndrome metabólico y debatiendo si la obesidad abdominal era un factor esencial o no, hasta que en 2005 la Federación Internacional de Diabetes (IDF) intentó aunar las diferentes definiciones clínicas que se habían planteado hasta ese momento del síndrome metabólico.³⁶ De este modo, se hizo necesaria la presencia de la obesidad abdominal como un factor clave en el diagnóstico y se enfatizó en su medida a través de la circunferencia abdominal en detrimento del IMC.³¹

A día de hoy, los criterios que establecen el síndrome metabólico son los siguientes:

- *Obesidad central* (circunferencia de cintura ≥ 94 cm para varones caucásicos y ≥ 80 cm para mujeres caucásicas, con valores específicos ajustados a otras etnias).

La obesidad central debe estar presente con al menos dos de los siguientes cuatro factores:

- *Nivel elevado de triglicéridos*: ≥ 150 mg/dL (1.7 mmol/L), o estar a tratamiento para este desorden lipídica.

- *Colesterol HDL reducido*: < 40 mg/dL (1.03 mmol/L) en varones y < 50 mg/dL (1.29 mmol/L) en mujeres, o estar a tratamiento específico para este desorden lipídico.

- *Hipertensión*: tensión arterial sistólica ≥ 130 o tensión arterial diastólica ≥ 85 mmHg, o estar a tratamiento de hipertensión con diagnóstico previo.

- *Glucosa plasmática elevada en ayunas*: ≥ 100 mg/dL (5.6 mmol/L), o presencia de diabetes tipo II con diagnóstico previo. En caso de que la glucosa en ayunas fuese > 5.6 mmol/L o 100 mg/dL, se recomienda la prueba de tolerancia oral a la glucosa, aunque no es necesaria para el diagnóstico del síndrome metabólico.

La obesidad central junto con la resistencia a la insulina y la hipertensión son determinantes en el proceso de desarrollo del síndrome metabólico y las enfermedades cardiovasculares asociadas.³⁵ En los últimos años se ha podido comprobar que el riesgo cardiovascular vinculado a la obesidad se asocia más al tipo de tejido adiposo y a su localización que a la cantidad total de este.³⁷ Los estudios muestran una clara diferencia entre el tejido adiposo subcutáneo y el visceral en relación al riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares.^{37,38} La obesidad ligada al tejido adiposo subcutáneo no está asociada a un incremento en el riesgo de padecer patologías cardiovasculares pero, sin embargo, la obesidad central o abdominal sí se relaciona con un incremento en el riesgo de sufrir patologías como la resistencia a la insulina, la hipertensión y la diabetes mellitus de tipo II, con el consiguiente aumento de la probabilidad de presentarse el síndrome metabólico y patologías cardiovasculares.³⁹⁻⁴³ El estado de inflamación crónica a nivel sistémico que se da en la obesidad y su relación con las enfermedades cardiovasculares han propiciado que en los últimos años se hayan llevado a cabo numerosos estudios al respecto que, a su vez, han puesto de manifiesto el papel

fundamental que juegan las adipokinas en estos procesos patológicos.⁴⁴⁻⁴⁶ Como se ha mencionado anteriormente, existen diferencias sustanciales entre el tejido adiposo visceral y el subcutáneo, concretamente en referencia a su perfil de expresión de adipokinas y su vinculación con el síndrome metabólico.⁴⁷ El tejido adiposo visceral produce una gran cantidad de moléculas relacionadas con factores de riesgo cardiovasculares e inflamación como la IL-6, el inhibidor tipo 1 del activador de plasminógeno (PAI-1) o los glucocorticoides, mientras que el tejido adiposo subcutáneo produce adipokinas con función protectora como la adiponectina y la leptina.⁴⁸

El síndrome metabólico también se asocia con una disfunción endotelial y una disminución de la vasodilatación, especialmente en las arterias cerebrales, mesentéricas, coronarias y del músculo esquelético.⁴⁹ Esto es debido a un aumento en la secreción de citoquinas proinflamatorias, a la liberación de ácidos grasos libres, y a la alteración en la expresión de genes y vías de señalización celular a nivel del endotelio, lo que provoca un aumento del estrés oxidativo y de la resistencia a la insulina a nivel vascular.⁴⁹ Además, también existe un desajuste en el equilibrio entre la vasodilatación ejercida a través de la ruta NO/GMPc/PKG (óxido nítrico/guanosín monofosfato cíclico/proteína quinasa dependiente de GMPc) y la vasoconstricción a través de la endotelina 1 (ET-1) a favor de esta última.⁵⁰ Experimentos realizados en ratas Zucker con resistencia a la insulina han mostrado una reducción en la respuesta a la ruta NO/GMPc/PKG a través de la disminución de la producción de GMPc, de NO y de la activación de PKG, así como un aumento del estrés oxidativo, lo que promueve la vasoconstricción.^{49,51}

3.- Inflamación y metabolismo cardiaco

El corazón necesita un aporte constante y abundante de sustratos energéticos para llevar a cabo su función, y dichos sustratos se destinan a la generación de adenosín trifosfato (ATP) en la cadena respiratoria mitocondrial.⁵² Los cardiomiocitos son el tipo celular que presenta mayor contenido de mitocondrias, ya que estas representan un tercio del volumen de la célula.⁵³ A nivel cardiaco el contenido de ATP es relativamente bajo (5 $\mu\text{mol/g}$) y su tasa de hidrólisis muy elevada ($\sim 30 \mu\text{mol/g/min}$ en reposo), por este motivo los niveles de ATP en el miocardio sufren una renovación completa cada 10 segundos,⁵⁴ lo que implica que cualquier alteración en el equilibrio de la producción y

consumo de ATP puede inducir el desarrollo y progresión de diversas patologías cardíacas.⁵⁵

Existen una amplia variedad de sustratos energéticos que pueden ser utilizados por el corazón para el mantenimiento de su función, y su elección dependerá de la situación fisiológica del individuo.⁵³ En la etapa fetal de los mamíferos, durante el desarrollo del corazón, el principal sustrato energético para la producción de energía es la glucosa, mientras que la tasa de oxidación de ácidos grasos es muy baja.⁵⁶ Poco después del nacimiento y en el corazón adulto normal se produce una disminución de la disponibilidad de glucosa y un aumento de la disponibilidad de los ácidos grasos, lo que conlleva a una serie de cambios enzimáticos, incluyendo el aumento de la expresión de enzimas mitocondriales implicadas en la oxidación de ácidos grasos.⁵⁶

En el miocardio adulto la oxidación de ácidos grasos a nivel mitocondrial constituye la fuente primaria de energía intracelular (70%), seguido por los carbohidratos (20%), los aminoácidos y los cuerpos cetónicos que, mediante sus vías catabólicas específicas, convergen en la formación de Acetil-CoA, que a su vez se incorpora en el ciclo de Krebs para finalmente generar el ATP consumido por el corazón mediante la fosforilación oxidativa.⁵³ En condiciones fisiológicas normales, en el corazón las mitocondrias reciben principalmente Acil-CoA y piruvato, que son los metabolitos primarios de los ácidos grasos y los carbohidratos respectivamente.⁵³

La entrada de Acil-CoA en la mitocondria es un proceso finamente regulado, con un paso limitante a nivel de la acción de la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT-1), y la oxidación del piruvato está también controlada por la acción de la piruvato deshidrogenasa (PDH), por lo que la regulación de ambas rutas metabólicas se consigue principalmente mediante la modulación de la actividad de CPT1 y PDH.⁵⁷ Por el contrario, otros sustratos como el lactato, los cuerpos cetónicos o los aminoácidos, pueden entrar en la mitocondria directamente para ser oxidados.⁵³ El metabolismo de los cuerpos cetónicos origina Acetil-CoA y el de los aminoácidos conduce a la generación de cetoácidos, que son posteriormente metabolizados para entrar en el ciclo de Krebs, los cuerpos cetónicos y los aminoácidos contribuyen en menor medida al metabolismo oxidativo del corazón debido a su baja disponibilidad en condiciones fisiológicas normales.⁵³

Aunque el músculo cardíaco sano pueda utilizar varios sustratos, confiriéndole una alta flexibilidad,⁵³ los ácidos grasos son el sustrato energético predominante para el miocardio adulto normal y suponen aproximadamente un 70% del ATP producido a nivel cardíaco, lo cual es lógico si tenemos en cuenta que la oxidación de ácidos grasos aporta más energía que los demás sustratos⁵⁸ y el tejido adiposo es la principal forma de almacenamiento de energía pudiendo albergar entre 90.000-225.000 kcal, lo que constituye 100 veces más que los depósitos de carbohidratos (1.000-2.000 kcal).⁵⁹ En diferentes condiciones fisiológicas, como por ejemplo durante el ejercicio físico, la producción de lactato se incrementa sustancialmente a nivel del músculo esquelético, la ruta metabólica predominante a nivel de metabolismo cardíaco pasa entonces a ser la oxidación del lactato.⁶⁰ Otro ejemplo de la flexibilidad metabólica del músculo cardíaco es el que se da en condiciones de ayuno prolongado, donde los niveles de cuerpos cetónicos en sangre se encuentran elevados y son utilizados por el corazón como sustrato energético⁶¹ (Figura 4).

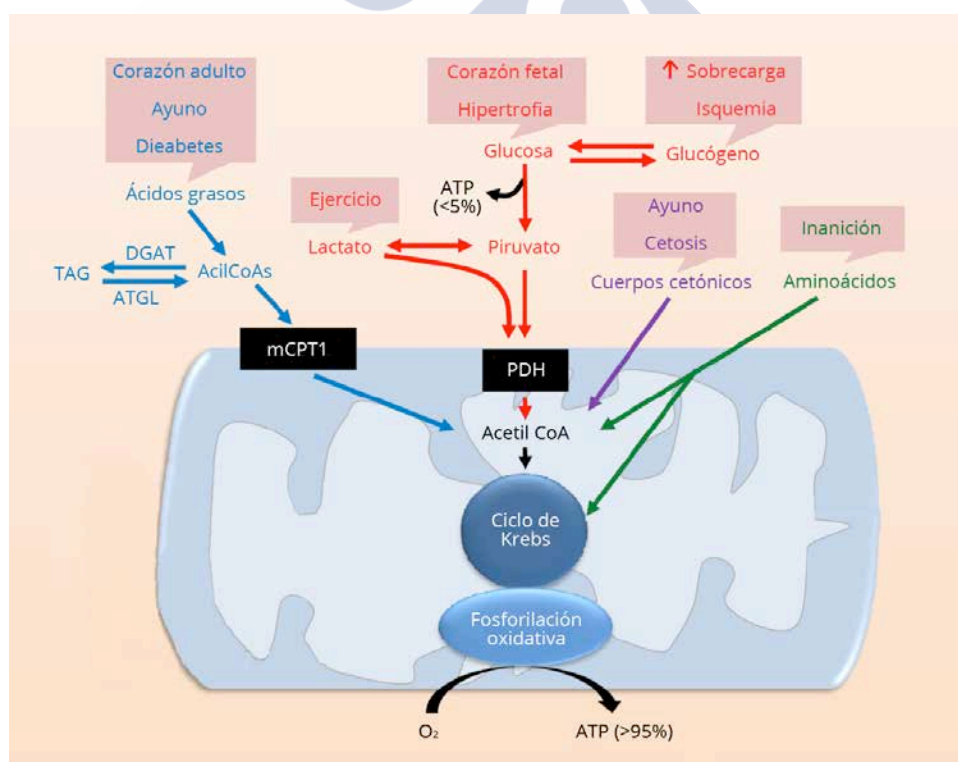


Figura 4. Metabolismo cardíaco en diferentes situaciones fisiológicas. Las cajas (en rosa) por encima de cada vía metabólica indican la patología y/o condición fisiológica en la que el sustrato específico se convierte en un factor predominante en el metabolismo cardíaco. TAG: triacilglicerol, DGAT: diacilglicerol aciltransferasa, ATGL: triacilglicerol lipasa, mCPT1: carnitín palmitoil transferasa 1 muscular, PDH: piruvato deshidrogenasa .⁵³

A nivel patológico, los defectos en el metabolismo cardiaco se relacionan con enfermedades como la diabetes, en la que parece ser que se produce un incremento en la captación y acumulación de ácidos grasos por parte de los cardiomiocitos, lo cual contribuye a una situación de lipotoxicidad y disfunción contráctil del corazón.⁶² Diferentes estudios han demostrado que la insuficiencia cardiaca moderada se encuentra asociada con una disminución progresiva en la oxidación de ácidos grasos, lo que a su vez se correlaciona con la severidad de la disfunción sistólica y conlleva una disminución de la capacidad oxidativa de las mitocondrias.⁶³ En las primeras etapas del desarrollo de la insuficiencia cardiaca, la utilización de ácidos grasos disminuye, mientras que la glucólisis aumenta; pero conforme se agrava esta patología se produce una inhibición de la ruta de transporte de glucosa en el miocardio^{64,65} (Figura 5).

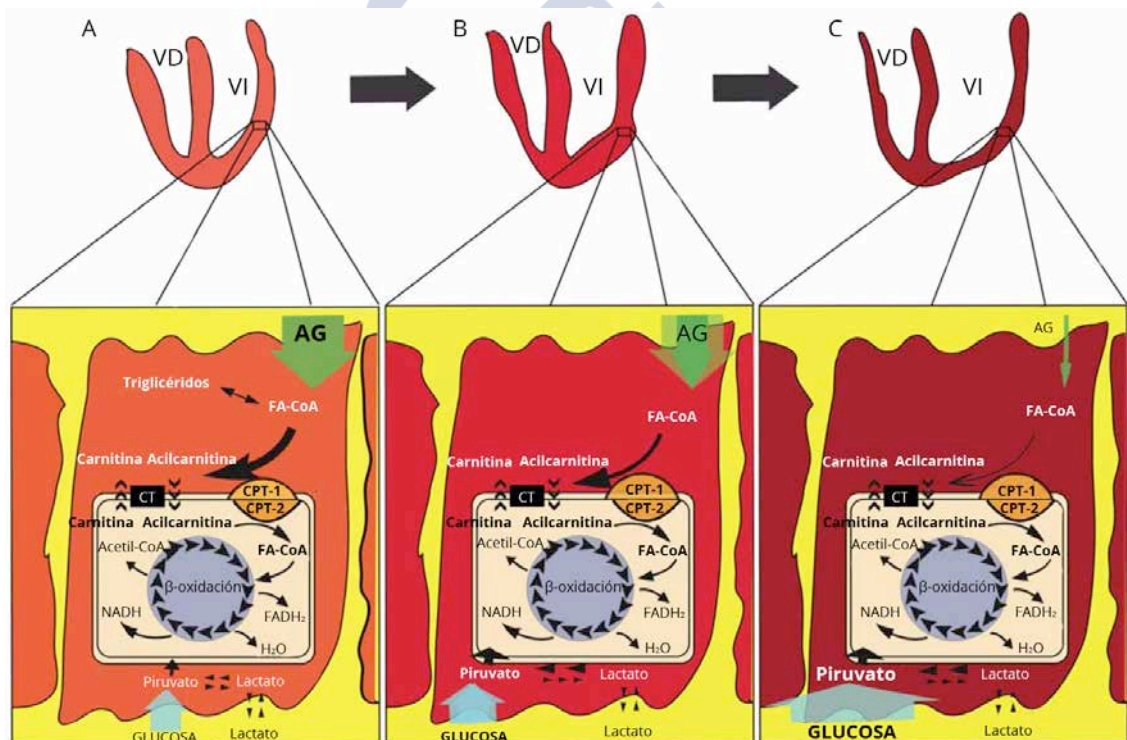


Figura 5. Utilización de los diferentes sustratos energéticos en cardiomiocitos. (A) Cardiomiocito sano. El cardiomiocito usa principalmente ácidos grasos (AG) que son transformados en la mitocondria gracias a la carnitina palmitoiltransferasa tipo 1 y tipo 2 (CPT-1 y CPT-2), y a la carnitina-aciltransferasa (CT) para posteriormente ser usados en la β -oxidación para producir FADH_2 , H_2O , NADH , y Acetil-CoA. La glucosa y el lactato entran en la célula y son transformados en piruvato mediante la glucólisis y el lactato deshidrogenasa, respectivamente. (B) En la insuficiencia cardíaca temprana la utilización de los ácidos grasos se debilita y la β -oxidación mitocondrial disminuye, mientras que la absorción y el metabolismo de la glucosa aumenta. (C) En los estadios finales de la insuficiencia cardíaca la absorción de ácidos grasos y su metabolismo se encuentran gravemente disminuidos, mientras que la captación de glucosa y su metabolismo se encuentran aumentados significativamente. VD: ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo; FA-CoA: acil-coenzima A; FADH_2 : forma reducida del dinucleótido de flavina y adenina; NADH : forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina.⁶⁵

La inflamación a nivel cardiaco aunque tiene efectos dañinos también puede participar en procesos de curación y reparación.⁶⁶ En algunos casos la dualidad de los efectos beneficiosos y deletéreos es evidente incluso dentro de la misma vía de señalización, como en el caso de factor nuclear kappa B (NF-κB), que puede conducir tanto a procesos inflamatorios dañinos, como a promover la supervivencia de los cardiomiocitos.⁶⁷ Por otro lado, las vías de señalización que regulan el metabolismo celular y la inflamación tienen complejas interacciones entre sí.⁶⁸ La proteína quinasa activada por (AMP AMPK) es el principal sensor de la energía celular y el principal regulador de la homeostasis energética celular, y tiene un papel muy destacado a nivel cardiomiocitario en situaciones de isquemia, hipoxia, falta de glucosa y estrés oxidativo.⁶⁶ La AMPK puede ser un importante modulador de la inmunidad innata y adaptativa, así como también actuar como un regulador negativo de la inflamación inducida por los ácidos grasos libres.⁶⁶ Se sabe también que moléculas proinflamatorias como la IL-6 y el TNF-α son capaces de disminuir el metabolismo de la glucosa en el miocardio y de provocar resistencia a la insulina mediante la supresión de AMPK y de la señalización de la insulina en el corazón.⁶⁹

Los trastornos cardiovasculares y metabólicos, como la hipertensión, la resistencia a la insulina, la dislipemia o la obesidad están relacionadas con la inflamación de bajo grado crónica y la alteración del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA).⁷⁰ Esta inflamación crónica es reconocida como un factor etiológico principal en los desórdenes metabólicos relacionados con el síndrome metabólico⁷⁰ y conlleva alteraciones del metabolismo cardiaco que pueden ser fundamentales en el desarrollo de patologías a nivel cardiovascular.^{69,71} En las enfermedades cardiometabólicas existe una compleja desregulación de las vías de señalización extracelulares e intracelulares, con la inflamación crónica de bajo grado como núcleo central,⁷⁰ y en el ámbito clínico, los niveles en sangre de citoquinas proinflamatorias como la proteína C reactiva, la IL-6 y ciertas adipokinas se encuentran correlacionadas positivamente con el exceso de tejido adiposo, y sus concentraciones disminuyen con la pérdida de peso.⁷²⁻⁷⁴

En la hipertensión, se ha sugerido que la vasoconstricción reduce la captación de glucosa a nivel sistémico y conduce a la hiperglucemia, y esta, a su vez, conduciría a la hiperinsulinemia y a la resistencia a la insulina.^{70,75} Por otro lado, existen varios mecanismos por los que la disminución de la sensibilidad a la insulina contribuye al

desarrollo de patologías cardiovasculares: la resistencia a la insulina mitiga los efectos vasodilatadores de la insulina y la hiperinsulinemia incrementa la actividad nerviosa simpática, reduce la natriuresis, promueve el crecimiento del músculo liso vascular, la disfunción endotelial y el aumento de los triglicéridos en sangre, con el consiguiente aumento del riesgo de aterosclerosis, de hipertensión y del riesgo de sufrir eventos cardiovasculares.⁷⁰ El incremento en la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona (el sistema hormonal que regula la presión sanguínea y el volumen extracelular) está asociado con una variedad de procesos fisiopatológicos e inflamatorios que incluyen la elevación de la presión arterial, la vasoconstricción, el remodelado cardíaco y la fibrosis renal.^{70,76} Además, existe un vínculo fisiopatológico diferente entre la elevación de la actividad del SRAA y las alteraciones metabólicas, puesto que a nivel hepático la Ang II (angiotensina II) tiene efectos opuestos a la insulina en el metabolismo de la glucosa e inhibe la glucógeno sintasa, contribuyendo al aumento de la resistencia a la insulina.^{70,77} Existen estudios desarrollados en modelos murinos de diabetes en los que se ha visto que la acción de la AngII sobre su principal receptor AT1-R (receptor de angiotensina de tipo 1) no solo conduce a un aumento de la vasoconstricción e hipopotasemia, sino que también actúa inhibiendo la movilización de GLUT4 (transportador de glucosa de tipo 4) a la membrana celular en el músculo esquelético y reduciendo la sensibilidad a la insulina.⁷⁸ Los efectos moduladores del SRAA sobre la actividad inflamatoria podrían ser incluso de mayor importancia puesto que, como se ha comentado anteriormente, la inflamación crónica juega un papel muy importante en la fisiopatología del síndrome metabólico y las enfermedades cardiovasculares, y se ha reconocido que la AngII puede mediar un efecto proinflamatorio a través del receptor AT1-R.⁷⁹ La activación del AT1-R es capaz de producir un incremento en la expresión de NFκB, IL-6 y MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos 1).⁸⁰ Además, en ratones obesos con una dieta alta en grasa y a los que se les ha abolido la expresión de receptor AT1-R se ha visto que tienen un menor daño e infiltración de macrófagos a nivel renal, y que presentan menor grasa corporal y niveles de colesterol, en comparación con ratones normales.^{70,81}

El tejido adiposo se comunica e influencia a otros órganos como el cerebro, el corazón, la vasculatura, el hígado y el músculo, a través de la producción y secreción de adipokinas, que actúan como hormonas con efectos endocrinos y paracrinós.⁸² Estas moléculas son importantes en la regulación de diversos procesos como la ingesta, la

distribución del tejido adiposo, la inflamación, la presión sanguínea, la hemostasis y la función endotelial.⁸² Cuando se produce una disfunción en los adipocitos, como puede ser el caso de la obesidad, el equilibrio entre la producción de adipokinas proinflamatorias y antiinflamatorias se altera, lo que puede tener efectos tanto a nivel local como sistémico en la respuesta inflamatoria, y contribuir al inicio y progresión de complicaciones metabólicas y cardiovasculares.⁸² Se han identificado una gran variedad de adipokinas, algunas de ellas poseen efectos antiinflamatorios como la adiponectina, la apelina, la omentina y la grelina, y otras tienen un destacado papel proinflamatorio y su expresión se encuentra incrementada en estados de obesidad, condición en la que actúan promoviendo enfermedades metabólicas y cardiovasculares.¹⁰ Dentro de las adipokinas proinflamatorias se encuentran el TNF- α , la leptina, la resistina o la chemerina entre otras muchas.¹⁰ Cada vez son más los estudios que ponen de manifiesto el vínculo que existe entre las adipokinas y la fisiopatología de determinadas enfermedades cardíacas, y aunque a continuación se describen brevemente solo algunos ejemplos de adipokinas relacionadas con la regulación de procesos inflamatorios a nivel cardíaco, más adelante se detallará más exhaustivamente la estrecha relación existente entre adipokinas y función cardiovascular.

Dentro de las adipokinas con función antiinflamatoria e implicaciones a nivel cardiovascular se encuentra la adiponectina. Se ha podido observar en el corazón de ratones en los que se ha abolido la expresión de adiponectina, que el estrés del retículo endoplasmático y la inflamación son significativamente más elevados que en ratones normales; mientras que en cardiomiocitos de rata se ha confirmado asimismo que la adiponectina puede disminuir el estrés del retículo endoplasmático y la inflamación.⁸³ En estudios desarrollados en modelos murinos también se ha podido comprobar que la adiponectina es capaz de disminuir la inflamación y la fibrosis cardíaca inducida por la AngII mediante la activación de la autofagia en macrófagos.⁸⁴ Además, la adiponectina puede inhibir la respuesta inflamatoria inducida por TNF- α mediante el descenso en la activación de NF- κ B en células humanas de endotelio vascular.⁸⁵ Otra adipokina, la apelina, es capaz de limitar la formación de ateromas y prevenir la formación de aneurismas aórticos a través de la limitación de la inflamación inducida por los macrófagos en modelos murinos de aterosclerosis.⁸⁶ La adipokina omentina, a su vez, se relaciona con la reducción de la inflamación a nivel vascular y de la disfunción endotelial, por lo que parece tener una función cardioprotectora.⁸⁷ La grelina por su

parte tiene la capacidad de inhibir el remodelado miocárdico post-infarto y mejorar la función cardíaca mediante la inhibición de la expresión de citoquinas proinflamatorias en ratas,⁸⁸ y el tratamiento con grelina también ha demostrado tener un efecto cardioprotector y antiinflamatorio en modelos murinos de cirugía cardíaca.⁸⁹ Asimismo, en ratones en los que se ha anulado la expresión de grelina se ha podido observar un incremento significativo de la inflamación y de la hipertrofia cardíaca en comparación con ratones normales, lo que pone de manifiesto el papel que desempeñaría la grelina endógena en la progresión de la hipertrofia mediante la activación de vías de señalización antiinflamatorias.⁹⁰

Entre las adipokinas proinflamatorias con efectos a nivel cardiovascular destaca el TNF- α , que contribuye al aumento de la resistencia a la insulina mediante la inhibición de la fosforilación y consiguiente activación del receptor de la insulina y del IRS1 (insulin receptor substrate 1) en músculo y tejido adiposo de rata.⁹¹ A nivel del miocardio, tanto en procesos isquémicos como en la insuficiencia cardíaca, los niveles de TNF- α se encuentran incrementados en humanos y modelos animales.^{92,93} Además, el TNF- α actúa en los macrófagos, las células del endotelio vascular y las células musculares lisas vasculares induciendo la expresión de genes proinflamatorios y proliferativos, que contribuyen al desarrollo de la aterosclerosis en modelos animales.⁹⁴⁻⁹⁶ La leptina por su parte ha demostrado tener diversos efectos sobre el sistema cardiovascular, puesto que sus niveles circulantes son significativamente más elevados en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica y se encuentran correlacionados con marcadores de inflamación como la proteína C reactiva.⁹⁷ Asimismo, se ha propuesto que la leptina podría contribuir a la caquexia cardíaca y a la disfunción endotelial a través de la activación de vías relacionadas con la inflamación, la proliferación y la calcificación.⁹⁸ La adipokina resistina parece también estar implicada en los procesos inflamatorios que conlleva la disfunción endotelial y la aterosclerosis.⁹⁹ Finalmente, la adipokina proinflamatoria chemerina se ha asociado fuertemente con la fisiopatología de diversas enfermedades cardiovasculares, y ha demostrado ser capaz de inducir resistencia a la insulina en cardiomiocitos de rata mediante el descenso en la captación de glucosa y en la fosforilación de AKT,¹⁰⁰ de promover la proliferación y la migración de las células de músculo liso vasculares y de incrementar la presión sanguínea en modelos murinos a través del incremento de la producción de especies reactivas del oxígeno y de la fosforilación de AKT y ERK1/2.¹⁰¹ Además sus niveles plasmáticos se encuentran más

elevados en pacientes con cardiomiopatía dilatada con respecto a individuos sanos y se encuentran correlacionados de forma significativa con marcadores de inflamación como el TNF- α , la IL-6 y la PCR.¹⁰²

En resumen, tal y como hemos visto en este apartado, tanto el SRAA como las adipokinas/citoquinas proinflamatorias han demostrado ser determinantes en el desarrollo de procesos inflamatorios asociados a la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares. Por ello, nuestro objetivo en este trabajo de tesis es estudiar los posibles efectos a nivel cardiomiocitario que podrían ejercer los moduladores de estos dos sistemas de gran relevancia para los procesos inflamatorios a nivel cardiovascular. Analizaremos por tanto los efectos de un regulador del SRAA, el aliskiren, y de una adipokina proinflamatoria, la chemerina, a nivel cardiomiocitario.





ALISKIREN



1.- Aliskiren e inhibición directa del SRAA en el tratamiento de la hipertensión arterial

El aliskiren es el primer fármaco oral inhibidor directo de la renina aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento de la hipertensión en marzo de 2007, y que pertenece a la tercera generación de inhibidores directos de la renina de origen no peptídico.¹⁰³

2.- Hipertensión arterial

La tensión o la presión arterial es la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de las arterias como resultado de la contracción ventricular izquierda, la resistencia de las arterias, la elasticidad de los vasos arteriales y la viscosidad y volumen de la sangre, por lo que su control dentro de unos parámetros adecuados conlleva un mantenimiento del equilibrio entre estos parámetros.^{104,105} Existen múltiples mecanismos fisiológicos que intervienen en el control de la presión arterial y que mantienen una estrecha interrelación para garantizar la homeostasis líquida del organismo y la correcta provisión de sangre a los distintos órganos.¹⁰⁴

El sistema nervioso simpático mediante el control del tono vascular a través de los receptores adrenérgicos es responsable de las adaptaciones a corto plazo en su mayor medida y cuando se dan cambios en la presión arterial son más lentos pierde su capacidad de control a favor del riñón.¹⁰⁶ La acción a nivel renal sobre la presión arterial se da a través de dos mecanismos: la regulación del contenido líquido del organismo y la producción de sustancias con propiedades vasoactivas y efectos tanto a nivel local como sistémico.¹⁰⁶ La aparición de trastornos en alguno o varios de estos mecanismos desempeñan un papel fundamental en el desarrollo y patogénesis de la hipertensión arterial.^{107,108}

La prevalencia media de la población mundial de tener la presión arterial incrementada era alrededor del 22% en adultos en el año 2014, según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y entre un 50-70% en la población mayor de 65 años.^{109,110} La hipertensión arterial es uno de los principales factores de riesgo de padecer

enfermedades cardiovasculares, que son la principal causa de muerte en los países desarrollados a nivel mundial¹¹¹ (Figura 6).

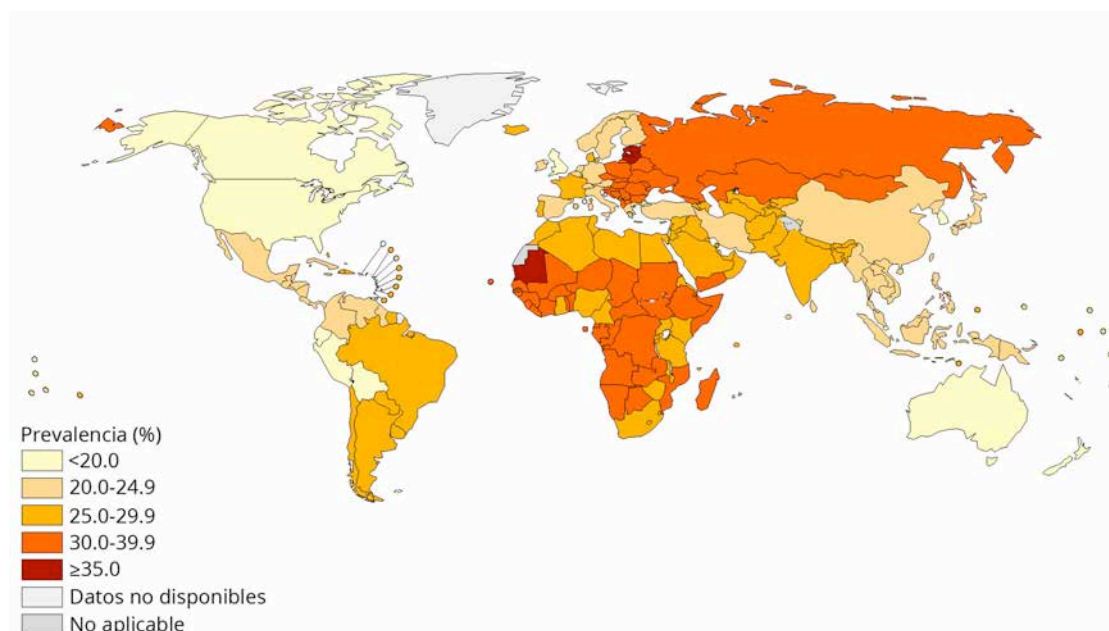


Figura 6. Prevalencia en el aumento de la presión arterial a nivel mundial en adultos en el período 2013 – 2014 según los datos de la OMS.¹⁰⁹

Se define la hipertensión arterial sistémica como la presión arterial sistólica en reposo igual o superior a 140 mmHg o como la presión arterial diastólica igual o superior a 90 mmHg que se presentan de forma continuada.¹¹² El riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares se ve incrementado hasta cuatro veces si se padece hipertensión y la mortalidad se duplica con cada aumento en 20 mmHg en la presión arterial sistólica y 10 mmHg en la presión arterial diastólica.¹¹⁰

En más del 90% de los casos, la hipertensión arterial tiene una etiología desconocida y se denomina como hipertensión arterial esencial o primaria, mientras que entre el 5-10% de casos de hipertensión arterial restante se conoce como hipertensión arterial secundaria y tiene una causa demostrable que se asocia con enfermedades subyacentes como la glomerulonefritis, nefropatía diabética, estenosis congénitas de la arteria renal y enfermedades de carácter endocrino.^{113,114}

La patogenia de la hipertensión arterial primaria no presenta una causas conocidas determinadas y es diagnosticada como de origen idiopático, aunque en el desarrollo de esta patología se ha señalado a una mezcla de diferentes factores tanto genéticos como

ambientales (entre los que destaca un consumo elevado de ácidos grasos poliinsaturados, tabaco y sal, sedentarismo, obesidad y un bajo consumo de potasio, calcio y magnesio).^{109,112} La hipertensión arterial primaria puede surgir de manera aislada o como parte de un complejo de alteraciones como son la resistencia a la insulina, la hiperglucemia en ayuno, la obesidad abdominal o la hiperlipemia, que se enmarcan dentro del síndrome metabólico y que se asocia con incremento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.¹⁰⁸

Además, la hipertensión arterial tiene repercusiones sobre los diferentes órganos, principalmente corazón, retina, cerebro y riñón.¹¹⁵ Si el mecanismo de compensación se cronifica puede originar insuficiencia cardíaca, arritmias o cardiopatía isquémica.¹¹⁵ Los daños ocasionados a nivel de la retina pueden ser de carácter hemorrágico y agudos debido a elevaciones importantes y bruscas en la presión arterial o de forma lenta e irreversible debido a la aterosclerosis.¹¹⁵ A nivel cerebral, se originan síntomas de carácter inespecífico como cefaleas, vértigo o alteraciones visuales, y también pueden originar accidentes neurovasculares y encefalopatía hipertensiva.¹⁰⁶ En el riñón la hipertensión puede originar alteraciones funcionales como insuficiencia renal, proteinuria o hematuria.¹⁰⁶ Aunque el corazón se adapta a un aumento crónico de la tensión arterial mediante la hipertrofia para normalizar el estrés sobre la pared ventricular izquierda, a la larga el mecanismo de compensación puede originar insuficiencia cardíaca, arritmias o cardiopatía isquémica.¹¹⁵

El diagnóstico temprano es fundamental para evitar el desarrollo de la cardiopatía hipertensiva que implica a menudo la aparición de alteraciones asintomáticas en la estructura y función cardíaca y que se inicia en una primera etapa con la aparición de la hipertrofia ventricular como respuesta a una presión arterial elevada crónica hasta el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en una segunda etapa.¹¹⁶ Las alteraciones subclínicas en la estructura cardíaca están asociadas con anomalías a nivel celular que incluyen la hipertrofia de cardiomiocitos y la fibrosis, y con cambios en la morfología que implica el remodelado del ventrículo izquierdo con un progresivo incremento en el grosor de la pared del ventrículo izquierdo como parte del mecanismo compensatorio.^{116,117} Entre los individuos con cardiopatía hipertensiva asintomática una gran cantidad desarrollará cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca con y sin fracción de eyección del ventrículo izquierdo preservada, y arritmias como la fibrilación auricular.^{116,117} Por lo tanto, el objetivo del tratamiento antihipertensivo no solo

persigue el descenso de la presión arterial sino también la reducción de la mortalidad y la morbilidad de enfermedades asociadas al exceso de presión.¹¹⁸ Sin embargo, a pesar de estar sometidos a tratamiento, una mayoría de pacientes hipertensos no tienen su presión arterial controlada hasta niveles normales, lo cual es un indicativo de la necesidad del desarrollo de nuevos fármacos y terapias en el tratamiento de la hipertensión.^{119,120}

3.- Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)

3.1.- Función a nivel sistémico

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) es uno de mecanismos hormonales mas importante en el control de la estabilidad hemodinámica mediante la regulación de la presión sanguínea, el volumen de líquido corporal y el equilibrio entre sodio y potasio¹⁰⁸ (Figura7). Tiene un papel importante en diversas patologías como la hipertensión, la insuficiencia cardiaca congestiva y la insuficiencia renal crónica, y se ha visto que la inhibición del SRAA puede ser una forma efectiva en el tratamiento de la patogénesis de estas enfermedades.¹²¹

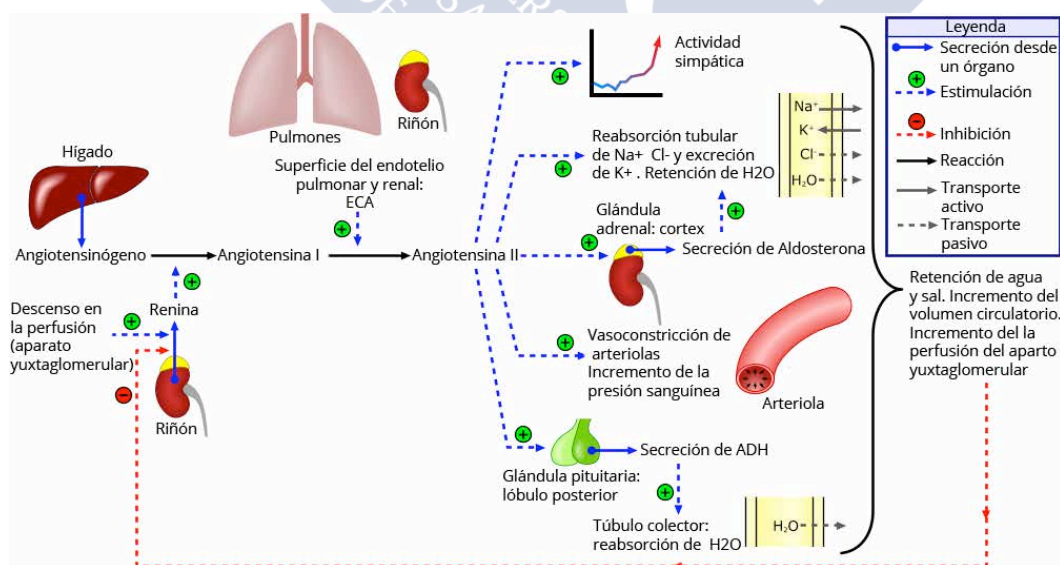


Figura 7. El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). El sistema SRAA puede ser activado por un descenso en la perfusión renal (aparato yuxtaglomerular), una concentración de sodio baja en el túbulo distal o por el sistema nervioso simpático. Las flechas discontinuas azules y rojas indican señales estimulatorias (+) o inhibitorias (-). En el túbulo renal y el túbulo colector la flecha discontinua grises indican procesos de transporte pasivo y las flechas continuas en gris indican procesos de transporte activo.¹⁰⁶

El SRAA puede ser activado como respuesta a una pérdida de volumen sanguíneo o una caída en la presión de perfusión sanguínea que puede ser debida a una hemorragia, deshidratación o situaciones de hiponatremia, y que funciona como un mecanismo compensatorio de dicha bajada de presión.¹⁰⁷ De esta forma, las células del aparato yuxtaglomerular renal sintetizan la renina como una forma inactiva que se secreta a la circulación sanguínea como respuesta a un nivel bajo del sodio filtrado por el riñón, a una hipotensión en las arteriolas aferentes de los glomérulos renales o a una activación por parte del sistema nervioso simpático.¹⁰⁷ En el torrente sanguíneo la pro-renina es activada por mecanismos proteolíticos y no proteolíticos (reversibles) que generan la forma activa de la renina.¹²² La renina activa reconoce en su sitio activo al angiotensinógeno circulante (sintetizado de forma constitutiva en el hígado) y mediante un proceso proteolítico lo transforma para dar lugar a la angiotensina I (AngI), esta última, a su paso por los capilares pulmonares y renales principalmente, es procesada por la enzima convertidora de angiotensina (ECA) para producir la angiotensina II (AngII), el principal efector en el sistema RAA.¹⁰⁷

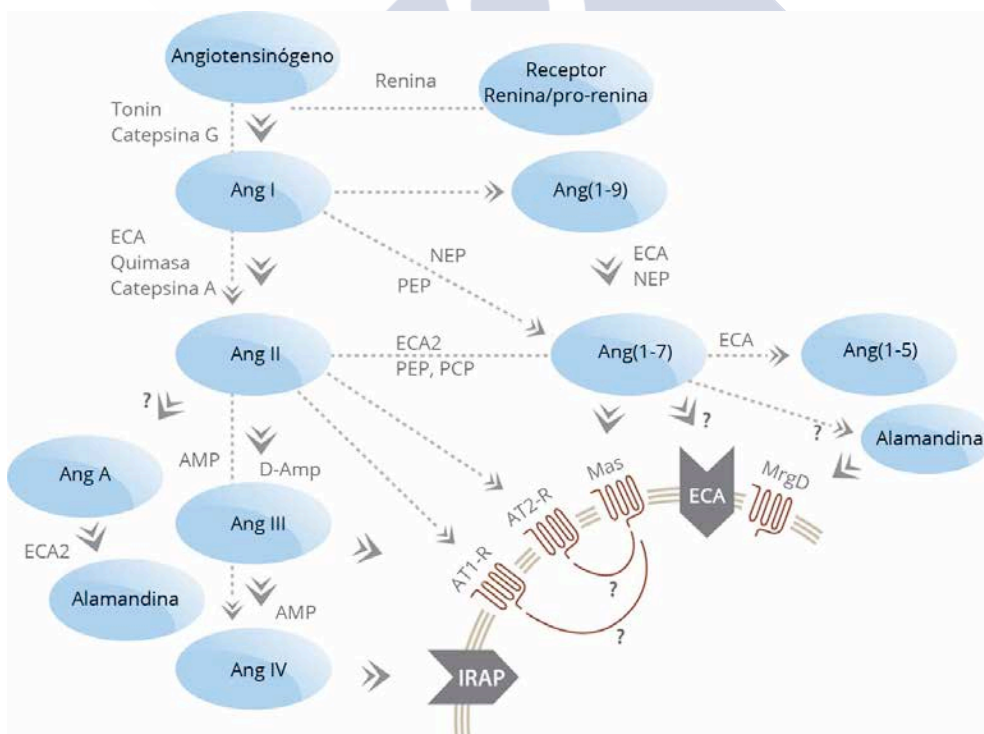


Figura 8. Vista actualizada y simplificada del SRAA. ECA: enzima convertidora de angiotensina; AMP: aminopeptidasa; Ang: angiotensina; AT1-R: receptor de angiotensina de tipo 1; AT2-R: receptor de angiotensina de tipo 2; D-Amp: dipeptidil aminopeptidasa I-III; IRAP: aminopeptidasa regulada por insulina; Mas: receptor Mas; NEP: endopeptidasa neutra; PCP: prolil carboxipeptidasa; PEP: prolil endopeptidasa.¹²³

La ECA es una exopeptidasa presente en la membrana de las células endoteliales, aunque también se puede encontrar de forma soluble en la circulación, y se expresa en todos los órganos pero con niveles elevados en pulmón, riñón, corazón, sistema digestivo y próstata.¹⁰⁷ Los mecanismos que controlan la formación y degradación de la AngII son fundamentales en el efecto fisiológico final de esta.¹²⁴ La ECA no es la única enzima con capacidad proteolítica sobre la AngI; la enzima convertidora de angiotensina tipo 2 (ECA2) es una carboxilpeptidasa que actúa sobre la AngI y AngII disminuyendo los niveles de AngII e incrementando los niveles de los metabolitos angiotensina(1-9) (Ang(1-9)) y angiotensina(1-7) (Ang(1-7)).¹²⁴ La Ang(1-7) es un heptapéptido y forma parte activa del sistema renina-angiotensina-aldosterona mediando su función presuntamente a través del receptor de angiotensina tipo 2 (AT2-R) y del receptor acoplado a proteínas G Mas.¹²⁵ La Ang(1-7) actúa como agente vasodilatador con acciones antihipertensivas, puesto que contrarresta parcialmente las acciones de la AngII.¹²⁵ Además, la Ang(1-7) se puede formar de forma adicional a partir de la Ang I por la mediación de endopeptidasas específicas¹²⁵ (Figura 8). Por lo tanto, el balance entre la ECA y ECA2 es un factor importante en el control de los niveles de AngII.^{125,126} La mayoría de las acciones fisiológicas de la AngII como los cambios proliferativos y los efectos profibróticos se ejercen a través del receptor de angiotensina de tipo 1 (AT1-R), aunque también puede unirse al receptor de angiotensina de tipo 2 (AT2-R) iniciando así efectos opuesto a los de AT1-R¹⁰⁷ (Figura 9).

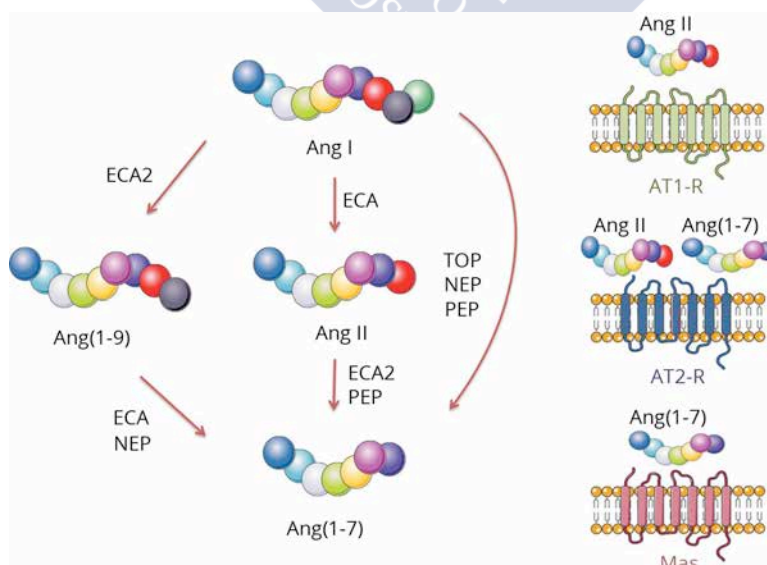


Figura 9. Diferentes vías de formación de la Ang(1-7) y los receptores de Ang(1-7) y AngII. ECA: enzima convertidora de angiotensina; ECA2: enzima convertidora de angiotensina 2; NEP: endopeptidasa neutral; PEP: prolil endopeptidasa; TOP: Pz-peptidasa.¹²⁷

La aldosterona es otra de las moléculas efectoras del SRAA cuya síntesis y secreción es estimulada por la AngII a través del receptor AT1-R en la corteza de la glándula suprarrenal.¹²⁸ A través de acciones específicas, la aldosterona promueve la reabsorción de sodio, la retención de agua y la pérdida de magnesio y potasio, modulando de esta forma el volumen en el espacio extracelular y la presión arterial.¹²⁹ Los efectos a nivel genómico de la aldosterona ocurren a través de la unión al receptor de mineralocorticoides (RM), translocación al núcleo, interacción con el ADN y estímulo de la expresión de genes que regulan los electrolitos y el equilibrio de fluidos.¹⁰⁸ A su vez, la aldosterona ejerce efectos por otras vías no genómicas a través del receptor AT1-R, de receptores acoplados a proteínas G y del receptor del factor de crecimiento epidérmico.^{130,131} Algunos de los efectores de estos receptores son las vías de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) ERK1-2 y p38, que median en el remodelado vascular, la inflamación, fibrosis y patologías cardíacas, renales y metabólicas.¹³²⁻¹³⁴

3.2.- Componentes centrales del SRAA

- Angiotensinógeno

El angiotensinógeno (Agt) es el único sustrato conocido de la renina, y después de ser procesado por esta se convierte en AngI, la cual es seguidamente procesada por la ECA o la ECA2 para ser convertida en AngII, el péptido con mayor actividad biológica del sistema RAA, o Ang(1-7) respectivamente.¹⁰⁷ El Agt pertenece a la superfamilia de las proteínas serpinas A8, proteínas conocidas por su función como inhibidoras de proteasas.¹⁰⁷ Estudios llevados a cabo en ratones en los que se había silenciado la expresión del gen de Agt han permitido profundizar y comprender el papel que desenvuelve el Agt a nivel fisiológico: los ratones deficientes en Agt tienen un fenotipo caracterizado por un incremento en la mortalidad perinatal, una marcada hipotensión, diversas alteraciones y patologías renales como la hidronefrosis, lesiones en las arterias renales y arteriolas y una marcada incapacidad en la capacidad de concentrar la orina.^{135,136} Este fenotipo es virtualmente idéntico al que presentan los ratones deficientes para la enzima ECA, la renina o la delección combinada de ambos subtipos del receptor de la angiotensina AT1-R (AT1a-Ry AT1b-R), lo que evidencia que el principal papel del Agt a nivel fisiológico es la contribución en la generación de la AngII.¹³⁷⁻¹⁴⁰

El Agt es sintetizado en el hígado por los hepatocitos y secretado a la circulación sanguínea después de la escisión del péptido señal en el extremo amino-terminal o N-terminal. Aunque el hígado es la principal fuente de Agt en la circulación, también se ha comprobado que el Agt puede ser producido por otros tejidos como tejido adiposo, cerebro, corazón, riñón, pulmón, glándula suprarrenal, intestino, estómago, bazo, ovarios y vasos sanguíneos.¹⁴¹⁻¹⁴³ Además, se ha sugerido que la regulación de los niveles de Agt de forma independiente e individual en los diferentes tejidos podría conformar la base de un sistema renina-angiotensina local que operaría independientemente del SRAA circulatorio.¹⁴⁴⁻¹⁴⁷

- Renina

La renina es una aspartil proteasa que cataliza el primer paso en la activación del SRAA donde la renina activa rompe los 10 primeros aminoácidos del Agt para formar la AngI.¹⁰⁷ En humanos, hay un exceso de Agt en suero y la ECA está presente en el endotelio y el plasma, por lo tanto, la cantidad de renina en el torrente sanguíneo es un factor limitante que va a determinar los niveles de AngII y la actividad del SRAA.¹⁰⁷

La fuente principal de la renina circulante es el riñón, donde las células granulares del aparato juxtaglomerular, localizadas en las paredes de las arteriolas renales aferentes, son las responsables de la síntesis, almacenamiento y liberación de la renina en el riñón.¹⁴⁸ La renina se sintetiza como pre-pro-renina que es convertida a pro-renina tras su entrada en el retículo endoplásmico.¹⁴⁸ La mayor parte de la pro-renina (alrededor del 75%) se secreta de forma constitutiva, de forma que la concentración plasmática de pro-renina es 100 veces superior que la de renina.¹⁴⁸ El 25% restante se destinan a la secreción regulada, por lo que se almacena en protogranulos que se fusionan para crear granulos de renina maduros donde se crea un pH ácido que optimiza la actividad de varias proteasas, como la catepsina B y prohormona convertasas, que eliminan el pro-segmento de 43 aminoácidos que se localiza en el extremo N-terminal y que cubre el centro activo de la molécula para dar lugar a la renina activa.^{148,149} La renina activa se acumula en granulos que serán secretados por exocitosis a la circulación sanguínea ante la estimulación de las células yuxtaglomerulares¹⁴⁹ (Figura 10).

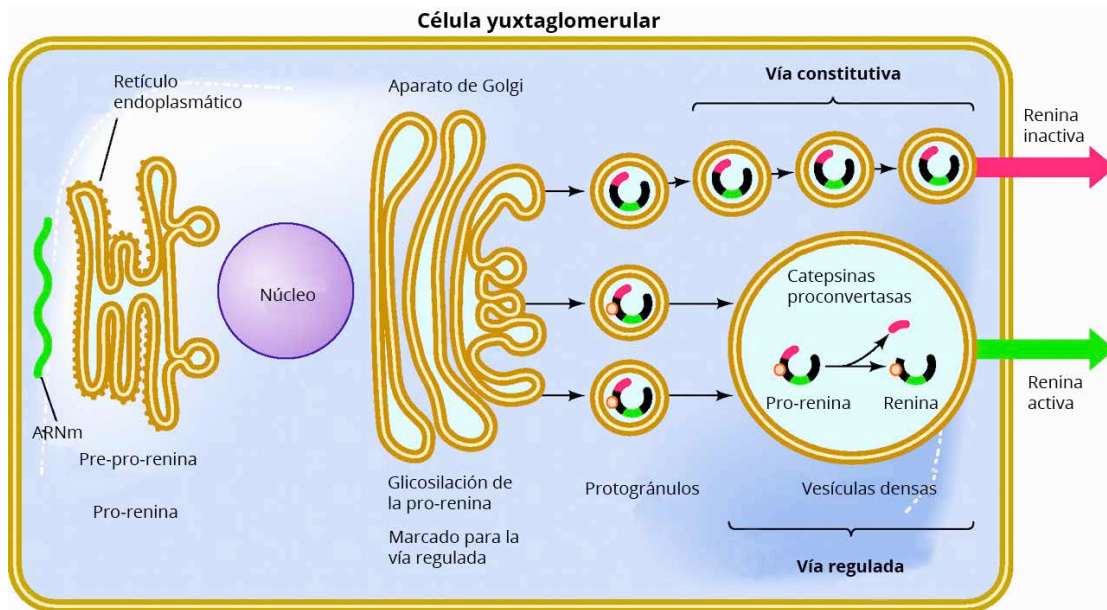


Figura 10. Síntesis y secreción de la renina en las células yuxtaglomerulares. Después de la traducción la pre-pro-renina entra en el retículo endoplasmático, donde se elimina el péptido señal. La pro-renina se traslada al aparato de Golgi, donde tiene lugar su glicosilación. En la región trans-Golgi se liberan vesículas que contienen la pro-renina, la cual se secreta de forma constitutiva. La pro-renina marcada para la secreción se almacena en protogranúlos que se fusionan para formar gránulos maduros de renina, en los cuales se escinde el pro-segmento y la renina se activa. Los gránulos maduros se almacenan y se liberan por exocitosis regulada.¹⁴⁹

La secreción de renina está regulada principalmente por 4 factores independientes:¹⁴⁹

- Barorreceptores renales en la arteriola aferente: estimulan la secreción al recibir señales de baja perfusión sanguínea.
- Cambios en la reabsorción de cloruro de sodio en la mácula densa del túbulo distal: una baja concentración de iones Cl^- estimula su secreción.
- Estimulación del sistema nervioso simpático a través de los receptores β -adrenérgicos.
- Retroalimentación negativa por la acción directa de la AngII en las células yuxtaglomerulares: inhibe la secreción de renina.

La estructura molecular de la renina es de 2 lóbulos entre los que se localiza una hendidura que constituye su centro activo.¹⁵⁰ La actividad catalítica del centro activo reside en dos residuos aspárticos, localizados uno en cada lóbulo de la molécula.¹⁵⁰ Un componente clave del sitio activo es una subregión específica para la renina y única entre todas las aspartato proteasas, que tiene la capacidad de alojar 7 aminoácidos específicos del sustrato, el Agt, y cortar la Leucina¹⁰ y Valina¹¹ de este para generar AngI¹⁵⁰ (Figura 11). Esta reacción es el paso limitante para la formación de AngII

puesto que, ni la AngI ni la AngII pueden ser sintetizadas del todo en ausencia de la renina.¹⁵⁰

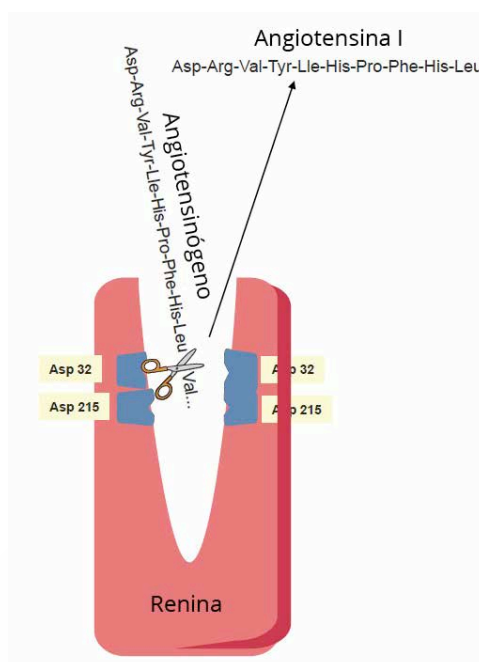


Figura 11: Procesamiento del angiotensinógeno por la renina activa.¹⁵¹

- Enzima convertidora de angiotensina (ECA)

La ECA es una enzima que genera el péptido con actividad biológica AngII mediante la escisión de dos aminoácidos del extremo C-terminal del precursor AngI.¹⁰⁷ La ECA se expresa en la superficie de las células endoteliales a lo largo del cuerpo y es particularmente abundante en el pulmón, intestino, placenta y riñón.¹⁰⁷ Mediante rotura enzimática del dominio transmembrana de la ECA se forma la ECA soluble que circula en plasma.¹⁰⁷ Aunque la ECA tiene un papel central en el SRAA debido a que es la responsable de la formación del principal efector del sistema, la AngII, también existen otros péptidos con actividad biológica que son sustratos de la ECA.¹⁰⁷ Uno de los más importantes es la bradiquinina, la cual es un potente vasodilatador que puede ser procesado por la aminopeptidasa P, la carboxipeptidasa N y la ECA para anular su acción y convertirlo en un péptido inactivo, contribuyendo de forma adicional a modular la presión sanguínea más allá de la conversión de la AngI en AngII.¹⁰⁷

Se han identificado enzimas homólogas a la ECA, una de ellas, la ECA2, comparte más del 40% de homología a nivel proteico con el dominio catalítico y, al igual que la ECA, se expresa en la superficie de determinadas poblaciones de células endoteliales.^{152,153}

Sin embargo, la distribución de la expresión de la ECA2 no es tan ubicua como la ECA, la expresión de la ECA2 es más limitada y se restringe al riñón, corazón y testículos, aunque existen nuevos estudios ponen de manifiesto la importancia a nivel fisiológico de la ECA2 y su expresión en otros tejidos como el cerebro, tejido adiposo y páncreas.¹⁵⁴⁻

159

Las diferencias en cuanto a la especificidad del sustrato también son evidentes entre la ECA y la ECA2. La ECA2 puede hidrolizar la AngII con una alta eficiencia pero al contrario que la ECA, posee una actividad mucho más baja sobre la AngI.^{156,160} La hidrólisis de la AngII por la ECA2 (y también por las prolil endopeptidasas) origina los metabolitos Ang-(1-9) y Ang-(1-7), este último puede actuar a través de los receptores Mas y AT2-R y generar efectos opuestos a la AngII induciendo la secreción de compuestos con actividad vasodilatadora como el óxido nítrico (NO), la bradiquinina y la protaglandina E₂ (PGE₂).^{123,161,162} La ECA2 parece tener efectos modestos sobre la función cardiovascular en el control de la presión arterial, aunque la actividad de la ECA2 podría tener efectos más profundos en la susceptibilidad a diferentes patologías como la hipertensión y la hipertrofia cardíaca, y estudios recientes llevados a cabo con modelos experimentales y pacientes han demostrado que la ECA2 puede participar en procesos inflamatorios, el desarrollo de la aterosclerosis y de patologías renales como la nefropatía diabética.¹⁶³⁻¹⁶⁸

- Angiotensina II

Como principal molécula efectora del SRAA, la angiotensina II es una hormona con un papel crítico que afecta a la función de la mayoría de órganos, especialmente al corazón, riñón, vasculatura y cerebro, y que ejerce su función a través de los receptores de AngII AT1-R, AT2-R, AT3-R y AT4-R.¹²⁴ La estimulación de la AngII de forma puntual tiene efectos directos en la homeostasis de sodio y agua, la vasoconstricción y la presión sanguínea.¹²⁴ Sin embargo, la estimulación crónica de la AngII produce hiperplasia e hipertrofia en las células musculares lisas vasculares, hipertrofia y remodelado cardíaco, reestenosis, fibrinólisis y fibrosis renal.¹²⁴

Aunque se han identificado varios receptores para la AngII, la mayor parte de sus efectos fisiológicos están mediados por los receptores de angiotensina AT1-R situados en la membrana celular, los cuales están ampliamente distribuidos en la mayoría de los órganos, incluidos hígado, glándula suprarrenal, cerebro, pulmón, corazón y

vasculatura.¹⁰⁷ A través de los receptores AT1-R se produce la reabsorción de sodio a nivel tubular en el riñón, la secreción de aldosterona por la glándula suprarrenal, la contracción del músculo vascular liso, secreción en el hipotálamo de la vasopresina (ADH) y retroalimentación negativa e inhibición en la secreción de la renina por el aparato yuxtaglomerular.¹⁰⁷

El receptor AT1-R es un receptor con siete dominios transmembrana y que actúa acoplado a proteínas $G_{\alpha q}$ que median su señalización a través de la fosfolipasa C e inositol trifosfato (IP_3) para desencadenar un incremento en el Ca^{2+} intracelular.¹⁰⁷ Sin embargo, el receptor AT1-R también se ha relacionado con las janus quinasas (JAK) y las MAPK ERK 1/2, JNK y p38 a través de las cuales la AngII activa cascadas de señalización que promueven la diferenciación, proliferación, migración y fibrosis de células musculares lisas vasculares.^{107,169} Por lo tanto, los receptores AT1-R no solo modulan el tono vascular, además pueden estimular el crecimiento e hipertrofia de las células musculares lisas y contribuir al remodelado vascular en la hipertensión.^{170,171}

Los centros de control cardiovascular ubicados en el sistema nervioso central también poseen una potente capacidad para influir en la presión sanguínea y la homeostasis de fluidos.¹⁰⁷ A nivel del sistema nervioso central los receptores de angiotensina del subtipo AT1a-R median los efectos presores sistémicos de la AngII mientras que la activación del subtipo AT1b-R estimula la respuesta de la sed y de ese modo regula el equilibrio de agua a través de un mecanismo neurogénico central.¹⁷²

La AngII, a través del receptor AT1-R, está directamente implicada en el estrés oxidativo de las células musculares lisas vasculares y células endoteliales activando las nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasas de membrana, que cataliza la reacción de oxidación del NADH o NADPH a NAD^+ o $NADP^+$ utilizando el oxígeno molecular y produciendo especies reactivas del oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno o el anión superóxido.^{173,174} Los ROS no solo son subproductos tóxicos derivados del metabolismo sino que actúan a nivel intracelular e intercelular como segundos mensajeros y se ha sugerido que las acciones no hemodinámicas del receptor AT1-R, como la generación de ROS, promueven la inflamación y cambios en la estructura vascular que perpetúa el desarrollo de la hipertensión.^{173,174} La regulación de estos receptores parece proporcionar un mecanismo de unión entre la hipertensión y varios desórdenes como hiperlipidemia y la resistencia a la insulina, ya que el LDL y la

insulina aumentan la expresión de estos receptores al estabilizar su ARNm de forma post-transcripcional¹²⁴ (Figura 12).

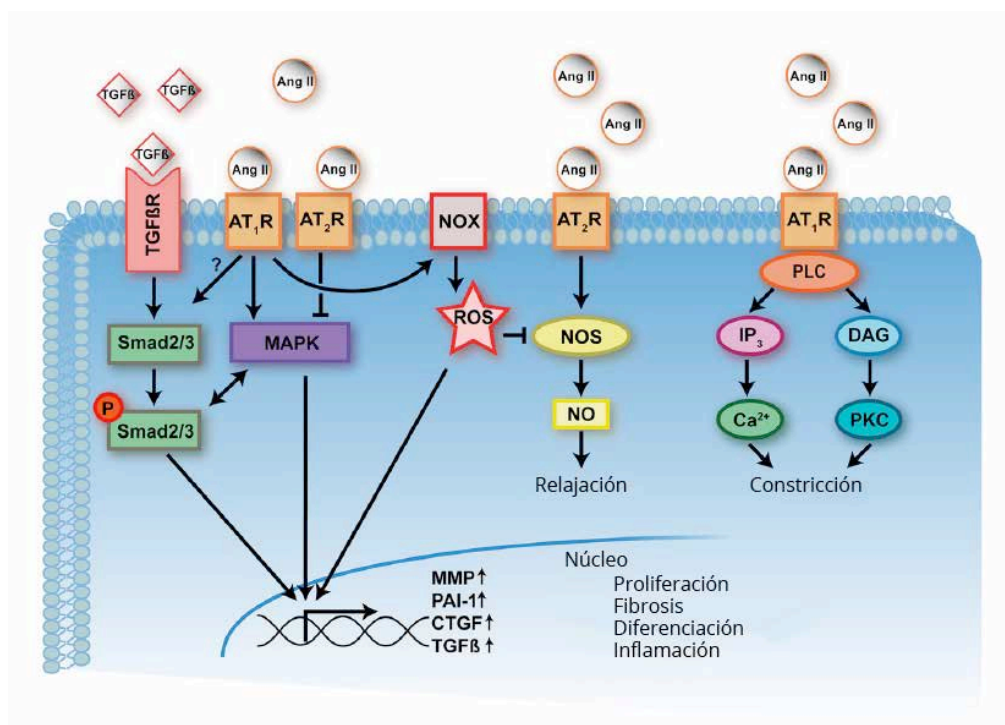


Figura 12: Efectos de la AngII a través de sus receptores AT1-R y AT2-R en el remodelado vascular y la vasoconstricción/vasodilatación. El factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β) se une a su receptor y activa la vía Smad2/2 que junto con las MAPK activadas por la estimulación del receptor AT1-R actúan en conjunto para regularla transcripción de genes diana (metaloproteinasas de la matriz (MMP), inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF)) que da como resultado un aumento de la proliferación, producción de matriz extracelular y fibrosis, diferenciación e inflamación. La estimulación de los receptores AT1-R aumenta de forma adicional la actividad de la NADPH oxidasa (NOX) y, en consecuencia, aumentando la producción de especies reactivas del oxígeno, lo cual a su vez también regula la transcripción de los genes mencionados anteriormente. La estimulación de los receptores AT2-R inhibe esta ruta a través del bloqueo de las MAPK. Los receptores AT2-R también inducen vasodilatación mediante la estimulación en la producción de NO por la NO sintasa (NOS) y contrarrestarían los efectos constrictores que se producen por efecto de la estimulación de los receptores AT1-R (mediados por la vía inositol trifosfato (IP₃)-Ca²⁺ y diacilglicerol (DAG)-proteína quinasa C (PKC)). Bajo condiciones patológicas, las especies reactivas del oxígeno desacoplan la NOS y en consecuencia disminuye la producción de NO.¹²¹

Los receptores AT2-R están presentes principalmente durante el desarrollo fetal y su expresión disminuye después del nacimiento.¹⁰⁷ Sin embargo, los receptores AT2-R se expresan en diferentes tejidos en individuos adultos como el riñón, glándula suprarrenal y cerebro, y sus niveles pueden verse modificados tanto por la AngII como por ciertos factores de crecimiento.¹⁰⁷ Además, se ha sugerido que la activación de los receptores AT2-R estimula la bradiquinina, NO y el guanosín monofosfato cíclico (cGMP), y la

activación de esas vías puede mediar acciones que promueven la natriuresis y el descenso en la presión sanguínea¹⁰⁷ (Figura 13).

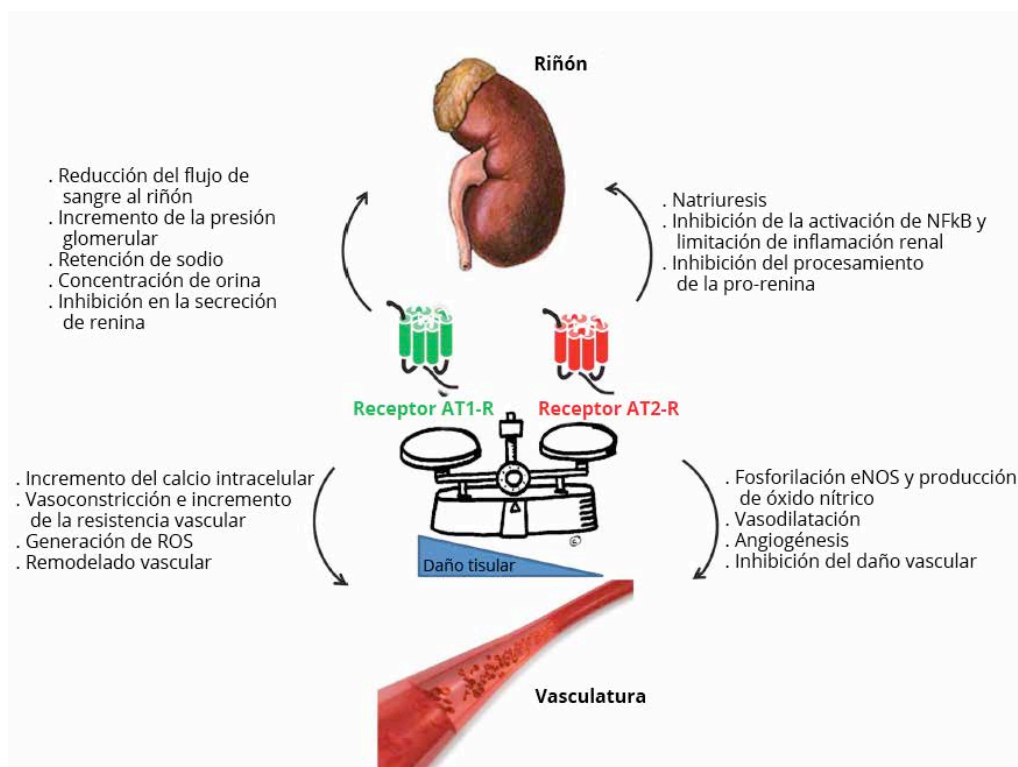


Figura 13: Conjunto de acciones de los receptores de angiotensina en el riñón y la vasculatura. El efecto de la estimulación de los receptores AT2-R se oponen y mejoran los efectos pro-hipertensivos e inflamatorios de la estimulación de los receptores AT1-R.¹⁰⁷

Los receptores AT3-R y AT4-R son dos nuevos subtipos de receptores de la angiotensina pobremente caracterizados, por lo que todavía se desconoce si ejercen funciones determinantes en el SRAA.¹⁷⁵ Aunque inicialmente se pensaba que los metabolitos derivados de la AngII, como la angiotensina IV, eran productos sin actividad biológica fruto de la degradación de esta, actualmente se sabe que la angiotensina IV tiene actividad y actúa a través de su unión al receptor AT4-R modulando la secreción de oxitocina en la amígdala y desempeñando funciones de regulación en el sistema nervioso central.^{176–178} Además, estudios recientes han demostrado que la angiotensina IV a través del AT4-R tiene la capacidad de proteger a nivel cardíaco la acción de la AngII, mediante la inhibición de la apoptosis en células cardíacas, la hipertrofia de los cardiomiocitos y la proliferación de fibroblastos inducidos por la AngII en corazón de rata.¹⁷⁹

- Aldosterona

La vía de actuación de la aldosterona funciona a través de la inducción y modulación de la transcripción de genes mediante el receptor citoplasmático/nuclear de la aldosterona o receptor mineralcorticoide (MR) en las células del túbulo colector cortical del riñón.¹⁰⁷ Una vez que la aldosterona se une al MR, el complejo dimeriza, migra al núcleo y se une a secuencias específicas del ADN activando la transcripción de genes y desencadenando la expresión de varias quinasas intracelulares como la quinasa regulada por suero y glucocorticoides 1 (SGK-1), proteínas K-Ras y la proteína WNK4.¹²¹ Esto conduce a un incremento de la expresión del canal de Na⁺ en las células epiteliales, del canal medular exterior renal de K⁺ y la bomba Na⁺/K⁺ a nivel basolateral,¹⁸⁰ de esta forma se ve incrementada la actividad del canal de Na⁺ y la reabsorción de Na⁺ a nivel renal, cuyo resultado es un aumento de volumen y presión sanguínea.¹⁸⁰

Aunque el mecanismo de acción de la aldosterona se creía que estaba restringido a las células del túbulo colector a nivel renal, estudios recientes han podido comprobar que el MR se expresa en células endoteliales y células de músculo liso vascular.^{130,181} En los últimos años se han descrito nuevas vías y rutas moleculares activadas por la interacción de la aldosterona con el MR presente en las células de músculo liso vascular y que contribuyen al remodelado vascular, inflamación vascular, proliferación e hipertrofia de las células de músculo liso, lo cual podría contribuir al desarrollo de la rigidez arterial.¹⁸²⁻¹⁸⁴ En las células endoteliales de la vasculatura la aldosterona a través del MR incrementa la expresión de canales de Na⁺ y el incremento de la actividad de estos canales en combinación con unos niveles plasmáticos elevados en sodio conducen a un aumento de la rigidez arterial provocado por la entrada de sodio a las células.¹²¹ Una consecuencia directa de esta rigidez es un descenso en la secreción de NO endotelial producido por la NO sintasa, por lo que la presencia de altos niveles de aldosterona en sangre junto con una elevada ingesta en sal puede contribuir a incrementar la presión arterial de forma independiente a los efectos renales de la aldosterona.^{121,185}

3.3.- SRAA local

La renina se acumula como enzima activa en las células yuxtaglomerulares y se secreta al torrente sanguíneo tras la estimulación del aparato yuxtaglomerular, mientras que la pro-renina se secreta de forma constitutiva sin variar sus niveles plasmáticos ante estímulos puntuales.¹⁴⁹ La pro-renina posee una baja actividad enzimática sobre el

angiotensinógeno, siendo esta menos del 3% de la actividad de la renina activa.¹²² La renina activa es sintetizada de forma exclusiva en el riñón, pero la pro-renina se sintetiza también en otros tejidos como las glándulas suprarrenales, ovarios, útero, testículos y corazón.¹⁴⁹

El hecho de que la pro-renina se encuentre en humanos en altas concentraciones ha propiciado la búsqueda de un posible receptor de la pro-renina al que se una y se active de forma local, ofreciendo una posible explicación a la gran cantidad de pro-renina que existe en comparación con la renina (más de 100 veces) y funcionando como un posible regulador de la generación de angiotensina a nivel tisular.¹²¹ Hasta el momento hay dos candidatos: el primero, con menor relevancia, es el Igf2r/M6F, un receptor que en la membrana celular se puede unir al factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF-2) o a la renina, y en el interior celular está implicado en el reconocimiento de proteínas marcadas con manosa-6-fosfato;^{186,187} el segundo es el denominado receptor de pro-renina o (P)RR, un receptor de membrana al cual se une la renina y la pro-renina, y que en la última década ha sido objeto de amplio estudio.¹⁸⁸ La eliminación de la expresión génica del (P)RR resulta ser letal, al contrario que la eliminación de la expresión del gen de la renina;¹⁸⁹ lo que podría estar relacionado con los últimos estudios en los que se ha comprobado 1) que el (P)RR se encuentra asociado a las ATPasas de tipo V o bombas de protones vacuolares (presentes en la membrana de orgánulos como los endosomas, lisosomas y vesículas secretoras) y 2) que es necesario para el correcto funcionamiento de estas.¹⁹⁰

Actualmente existe un debate sobre distintos aspectos de la organización del SRAA. En primer lugar, algunos autores siguen debatiendo el hecho de que el receptor (P)RR sea capaz de transducir la señal de renina y pro-renina, debido a que en algunos estudios se ha postulado que las concentraciones de renina y pro-renina necesarias para la unión a este receptor estarían muy lejos de las concentraciones que están presentes tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas, sugiriendo que la función del (P)RR estaría limitada a su papel en la acidificación de vacuolas en el interior celular.¹⁹¹ Sin embargo, estos resultados no han impedido que el receptor (P)RR haya seguido siendo objeto de estudio en los últimos años: A nivel renal se ha visto que el (P)RR desempeña funciones en la regulación de la homeostasis del potasio,¹⁹² que en células del túbulo colector la AngII afecta a su expresión, y conduce a un aumento de la actividad de la ciclooxigenasa 2 y de la expresión de genes profibróticos,¹⁹³ y que a través de vías

independientes de la AngII puede activar MAPK como p38 y ERK1/2, que a su vez producen un aumento de la actividad de JNK (quinasa c-Jun N-terminal) y de la NADPH oxidasa, con el consiguiente aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias.¹⁹⁴ Además, el receptor (P)RR se ha relacionado a nivel cerebral con el control central de la presión arterial,¹⁹⁵ y en el tejido adiposo se ha visto que regula la sensibilidad a la insulina, la masa grasa y el peso corporal.¹⁹⁶ Aunque en estos estudios se ha podido observar la activación de ciertas vías de señalización intracelulares desencadenadas a través del receptor (P)RR, no se ha comprobado que la activación del receptor sea mediada por la renina o la pro-renina; sin embargo, se ha comprobado que el tratamiento de neuronas de rata con pro-renina humana es capaz de provocar la activación del receptor (P)RR y, a su vez, desencadenar un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno, lo que sugiere que la activación de este receptor por la pro-renina podría ser viable a nivel fisiológico.¹⁹⁷

En segundo lugar, existe también un debate en torno a la existencia de sistemas SRAA locales en los diferentes tejidos, aunque lo que parece claro es que los efectos que se promueven a nivel sistémico por la inhibición de la renina y los efectos a nivel local podrían ser iguales, diferentes u opuestos.^{121,198} A pesar de la existencia de estudios en los que se ha demostrado que la AngII es producida por diferentes tipos celulares y podría desempeñar funciones importantes y específicas en los diferentes tejidos,^{199,200} en otros trabajos no se ha podido detectar la presencia de AngII a nivel intracelular después de abolir la expresión de los receptores de angiotensina,²⁰¹ sugiriendo que el riñón sería la única fuente de renina en el cuerpo y que la generación de angiotensina se llevaría a cabo de forma extracelular (en la sangre, fluido intersticial y la superficie celular), para después internalizarse a través de los receptores de angiotensina.¹²¹ También se ha propuesto la producción local de angiotensinógeno, en particular en el riñón, pero los últimos trabajos llevados a cabo en ratones en los que se suprimió la expresión de angiotensinógeno a nivel renal han mostrado niveles similares de AngII renal a los que presentan ratones normales.²⁰²

Actualmente existe una corriente de investigadores que plantean que la AngII se genera a nivel tisular (más del 90% de la AngII tisular es sintetizada a nivel local), pero depende de la renina producida por el riñón y el angiotensinógeno hepático como factores limitantes.²⁰³ Ambos difundirían al intersticio, permitiendo la generación de AngII a nivel local gracias a la ECA que se encuentra presente de forma ubicua unida a la

membrana celular, de esta forma, la AngII se uniría a los receptores de angiotensina seguida por su internalización, explicando la alta correlación que se da a menudo entre la AngII tisular y la densidad de receptores de angiotensina.²⁰⁴

A nivel cardiovascular, se ha podido demostrar en varios trabajos la existencia a nivel local en corazón y vasculatura de un SRAA cuya activación conduciría a cambios estructurales y funcionales independientes de los que ejerce el SRAA clásico.^{205,206} Además, también se ha descrito que los componentes de ese SRAA local se encuentran en diferentes tipos celulares del sistema cardiovascular, en los cuales desempeñarían un papel importante en la regulación de la homeostasis celular.^{198,205,207,208} Con respecto al origen de la renina cardiaca, existen estudios que han demostrado que esta podría ser captada desde el plasma por el tejido cardiaco en condiciones normales;^{205,209,210} pero su expresión podría verse incrementada en células cardiacas después de sufrir un infarto de miocardio; y se ha podido detectar asimismo una sobreexpresión de un transcrito de renina sin la porción correspondiente al péptido señal, por lo que no se secretaría y permanecería en el interior de la célula durante esa situación patológica.^{205,211,212}

A la luz de todos estos datos, podemos concluir que en la actualidad existen resultados dispares en lo que concierne a la existencia de un SRAA a nivel local. Son necesarias más investigaciones para esclarecer el papel que juega el SRAA a nivel local, y discernir si las células cuentan con todos los componentes del SRAA o, por el contrario, el sistema es parcial y se encuentra limitado por componentes que deben difundir desde el espacio intersticial.

3.4.- SRAA, inflamación y síndrome metabólico

La hipertensión es uno de los elementos fundamentales del síndrome metabólico y, a su vez, componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona se encuentran relacionados con otros del síndrome metabólico como la inflamación y la resistencia a la insulina.¹²⁸ El SRAA desempeña un importante papel en la iniciación y el mantenimiento de la inflamación y el remodelado vascular.¹³² La inflamación vascular conduce a la disfunción endotelial y esta, a su vez, media en la progresión de las enfermedades cardiovasculares.¹³² Un endotelio disfuncional crea un ambiente proinflamatorio que favorece el reclutamiento de células inflamatorias que juegan un papel fundamental en el desarrollo de la aterosclerosis.¹³²

La AngII afecta a todas las células vasculares (células endoteliales, células del músculo liso, fibroblastos, monocitos/macrófagos y cardiomiocitos), por lo que desempeña un papel crítico en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.¹²⁴ En estados patológicos, la Ang II actúa sobre las células vasculares, endoteliales y cardíacas promoviendo la generación de especies reactivas del oxígeno, la inflamación, el crecimiento, la migración y la fibrosis, lo que a su vez conduce a la aparición de patologías como la hipertensión, la aterosclerosis, la insuficiencia cardíaca, el fallo renal y la resistencia a la insulina¹²⁴ (Figura 14).

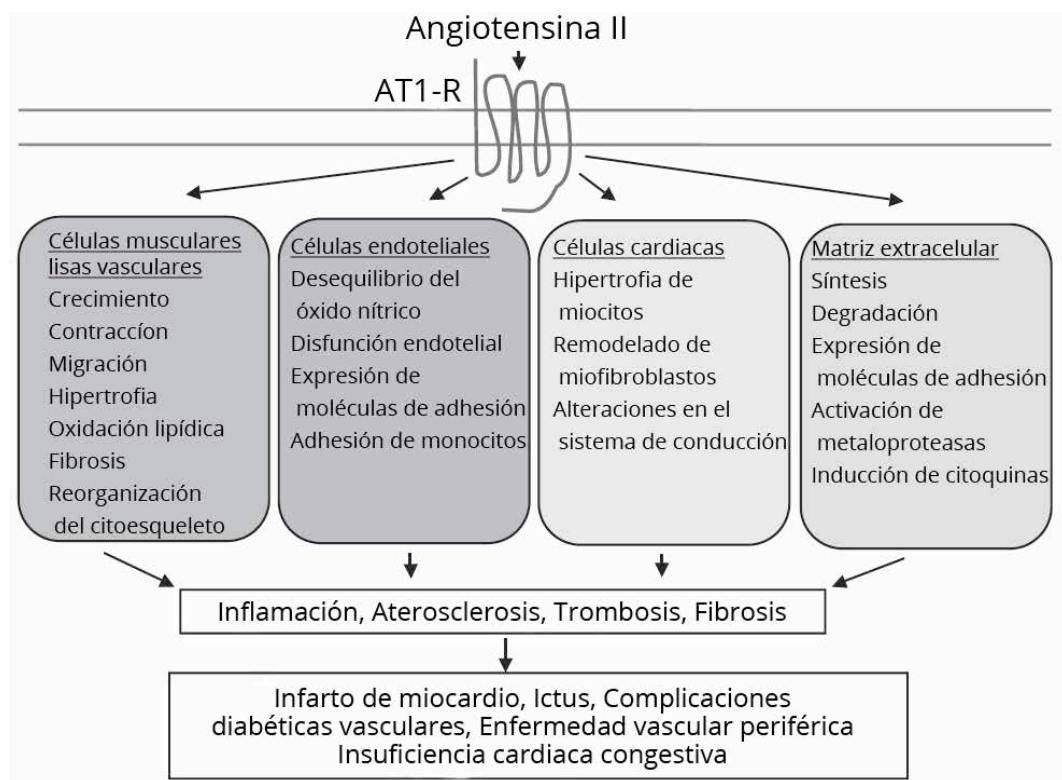


Figura 14: Papel de la AngII en la patología cardiovascular. La AngII tiene numerosos efectos en la modulación de la fisiología y patología cardiovascular mediante la activación de vías de señalización en células musculares lisas vasculares, células endoteliales y células cardíacas, afectando a su interacción con la matriz extracelular.¹²⁴

Existen evidencias que vinculan la hipertensión y la aterosclerosis a la inflamación mediada por la AngII. En experimentos *in vivo*, el tratamiento con AngII incrementa significativamente la adhesión de leucocitos a las arterias mesentéricas de rata.²¹³ Los estudios llevados a cabo en humanos y animales de experimentación han demostrado

que la AngII provoca una respuesta proinflamatoria en arterias, corazón y riñón a través de la regulación en la expresión de citoquinas y quimioquinas.¹³² En células humanas de músculo liso vascular la AngII induce la activación de NF- κ B y la expresión de la IL-6,²¹⁴ MCP-1 y TNF- α en monocitos.²¹⁵ En experimentos *in vivo* llevados a cabo en la aorta de ratas, se ha demostrado que la infusión de AngII induce un incremento en la expresión de VCAM-1 (proteínas que juegan un papel determinante en el desarrollo de la aterosclerosis) a través de la activación de NF- κ B, mientras que la administración de losartan, un antagonista del receptor de angiotensina AT1-R, inhibe la activación de NF- κ B inducida por la AngII y, en consecuencia, la acumulación de VCAM-1.²¹⁶ Experimentos *in vitro* llevados a cabo en células musculares lisas vasculares de rata han confirmado que la AngII aumenta la actividad de la MCP-1, y que el bloqueo de los AT1-R con losartan previene el aumento de la expresión de MCP-1 y la migración de monocitos no solo a la pared vascular sino también a otros órganos diana.²¹⁷ Además, la AngII es capaz de inducir daño en el endotelio vascular mediante la inhibición de la regeneración de las células endoteliales, actuando como un segundo mensajero que activa vías de señalización intracelulares como las de MAPK y AKT, que median la proliferación y apoptosis y de este modo la disfunción vascular.²¹⁸

Otro de los efectores del SRAA, la aldosterona, también ha demostrado estar implicada en procesos proinflamatorios y profibróticos en órganos diana.^{132,219} Se han asociados niveles elevados de aldosterona con el desarrollo de la aterosclerosis, la hipertrofia del miocardio, el remodelado ventricular, isquemia y fibrosis cardíaca.^{219–223} A nivel cardiovascular, la aldosterona también promueve la resistencia a la insulina y en células musculares lisas vasculares se ha comprobado que altera la señalización de la insulina mediante el aumento de la expresión del receptor de IGF-1 (IGF1R).^{223,224} Además, la infusión crónica de aldosterona induce estrés oxidativo en la aorta de rata, efecto que se ve revertido mediante la administración de espironolactona, antagonista del receptor de mineralocorticoide, que conlleva a una reducción en la generación de especies reactivas del oxígeno.²²⁴

Existen evidencias de que la AngII, además de sus efectos vasoconstrictores y proinflamatorios, también tiene efectos a nivel metabólico, puesto que se ha descrito que es capaz de atenuar los efectos metabólicos de la insulina y del factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-1) en músculo esquelético y cardíaco.²²⁵ Los mecanismos que producen este efecto inhibitorio consisten en la generación de ROS y en la activación de

proteínas de pequeño peso molecular como RhoA y Rac1, implicadas en una amplia variedad de funciones celulares.^{108,225} En las células endoteliales la insulina es capaz de activar la NO sintasa endotelial (eNOS), aumentando la producción de NO y la vasodilatación,²²⁵ mientras que la AngII, a través de los receptores AT1-R, induce un efecto opuesto a la insulina: disminuye la actividad de la eNOS y NO, promueve la producción de ROS e incrementa la resistencia a la insulina²²⁵ (Figura 15).

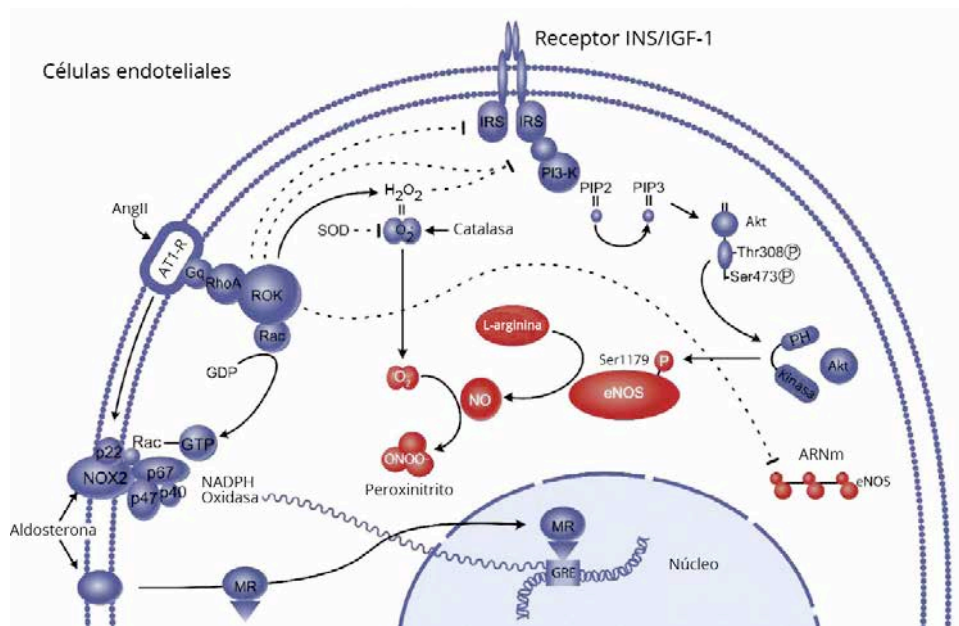


Figura 15: Efecto vascular de la insulina e IGF-1 y efecto opuesto de la AngII a través de receptores AT1-R y receptores de mineralocorticoides en células endoteliales. Los efectos de la insulina en los vasos sanguíneos están mediados parcialmente por un incremento en la producción de NO a través de la fosforilación y la activación de la eNOS. La activación de los AT1-R provoca un descenso en la disponibilidad de NO a través de la inducción de resistencia a la insulina, disminución en la estabilidad del ARNm de la eNOS y el incremento en la producción de ROS. Los mineralocorticoides, como la aldosterona, también activan la NADPH oxidasa con el consiguiente aumento en la generación de los iones superóxido (O_2^-) y la consecuente generación de peroxinitrito ($ONOO^-$). GRE: elemento de respuesta a glucocorticoides; IRS: sustrato del receptor de insulina; NOX2: subunidad catalítica de la NADPH oxidasa; p22, p47, p40 y p67: subunidades de la NADPH oxidasa; PH: dominio con homología a la pleckstrina; PI3-K: fosfatidilinositol 3 quinasa; PIP: fosfatidilinositol fosfato; PIP2: fosfatidilinositol difosfato; PIP3: fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato; ROK: Rho quinasa; SOD: superóxido dismutasa.²²⁵

4.- Tratamiento de la hipertensión arterial

El tratamiento de la hipertensión arterial tiene como objetivo la disminución de la morbimortalidad cardiovascular mediante la normalización de la presión arterial y el control de otros factores de riesgo cardiovasculares como la hipercolesterolemia, el tabaquismo, obesidad, diabetes y sedentarismo.¹¹¹ Como primera medida para el tratamiento de la hipertensión se deben llevar a cabo modificaciones en el estilo de vida enfocadas a la reducción de la presión arterial y a la prevención de enfermedades cardiovasculares, como son la reducir el peso, restringir el consumo de sal, limitar el consumo de alcohol, aumentar la actividad física, reducir el consumo de grasa total y grasa saturada y abandonar el tabaco.^{111,226,227} En la actualidad el tratamiento farmacológico para la hipertensión arterial está basado en la regulación del volumen sanguíneo con diuréticos, la supresión del sistema nervioso simpático con antagonistas de los receptores adrenérgicos periféricos o fármacos de acción central, la utilización de calcio-antagonistas y la inhibición del SRAA.¹²¹ En función del tipo de paciente y los efectos adversos de cada terapia se procederá a emplear uno u otro, siendo habitual la terapia combinada con varios tipos de medicamentos:¹²¹

Los diuréticos ejercen un efecto natriurético que produce una bajada de la presión sanguínea, sin embargo este efecto sobre el volumen intravascular es compensado en parte por el estímulo del SRAA. Por este motivo es recomendable la terapia combinada con fármacos inhibidores del SRAA.^{106,110}

Los β -bloqueantes desempeñan su acción mediante el bloqueo de los receptores beta-adrenérgicos sobre los que actúa el sistema nervioso simpático, aunque deja libres los receptores alfa-adrenérgicos que contrarrestan en parte el efecto hipotensor.¹²⁰ El efecto es temporal y desaparece tras un determinado período de tratamiento, aunque también se pueden utilizar β -bloqueantes que a su vez poseen un efecto α -bloqueante simultáneo.¹²⁰

Los calcio-antagonistas actúan mediante la inhibición de las corrientes de calcio a través de la membrana plasmática mediante el bloqueo de los canales de calcio de tipo L voltaje-dependientes, esto se traduce en una vasodilatación a nivel vascular, periférico y coronario. Se necesita una terapia combinada puesto que la vasodilatación producida

por los calcio-antagonistas estimula de forma refleja el sistema nervioso simpático y el SRAA.²²⁸

Los inhibidores del SRAA actúan mediante el bloqueo en diferentes componentes del SRAA como el bloqueo del receptor de la aldosterona, el bloqueo de la ECA, el bloqueo de los receptores de angiotensina II o, más recientemente, la inhibición directa de la renina.

4.1.- Mecanismos de inhibición farmacológica del SRAA

El tratamiento farmacológico para la inhibición del sistema renina-angiotensina-aldosterona puede llevarse a cabo a través de cuatro vías:¹²¹

- 1- Inhibición de la actividad de la aldosterona: antagonistas del receptor de mineralocorticoides (espironolactona).
- 2- Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina: bloqueo de la formación de angiotensina II a partir de angiotensina I (IECAs).
- 3- Inhibición de la actividad de la angiotensina II: antagonistas de los receptores AT1-R (ARAI).
- 4- Inhibición directa de la renina: Bloqueo en la generación de angiotensina I a partir del angiotensinógeno (aliskiren).

El receptor de mineralocorticoides ha sido una de las dianas terapéuticas en el tratamiento de la hipertensión desde que se descubriera hace más de 50 años su primer antagonista: la espironolactona.²²⁹ Aunque la monoterapia con la espironolactona tiene unos efectos modestos en el descenso de la presión arterial, recientemente ha resurgido como una terapia adicional en pacientes con hipertensión arterial resistente.²²⁹ Debido a la similitud estructural que presenta con la progesterona (la espironolactona tiene actividad antiandrogénica y efectos adversos importantes en hombres y mujeres) también se utiliza la eplerenona, que posee una mayor selectividad por el receptor de mineralocorticoide aunque tiene un efecto menos potente y más corto,²²⁹ y la finerenona, una molécula no esteroide con una gran selectividad por el MR diseñada para tener una mayor actividad a nivel cardíaco en comparación con los antagonistas

esteroideos del MR, y con el objetivo de mejorar la función cardiaca sin afectar a la homeostasis sodio/potasio en el riñón.²²⁹

Aunque los antagonistas del MR disminuyen la presión arterial y proporcionan protección contra el daño en órganos diana no son capaces de bloquear los efectos no genómicos de la aldosterona, entre los que se incluyen la estimulación de la contractilidad cardiaca y vascular y el empeoramiento de la homeostasis de la glucosa.^{230,231} Las limitaciones en cuanto a la efectividad de los antagonistas del MR ha conducido al desarrollo de los inhibidores selectivos de la aldosterona, fármacos con la capacidad de limitar la actividad de la enzima responsable de la síntesis de la aldosterona.²³²⁻²³⁴

Los IECA y ARAII actúan inhibiendo la síntesis y acción de la angiotensina II respectivamente, aunque el bloqueo que ejercen sobre el SRAA es incompleto puesto que no tiene acción sobre la ECA2, los receptores AT2-R, AT3-R y AT4-R, y las variantes de angiotensina AngIII, AngIV y Ang(1-7).¹²¹ A su vez, la actividad del SRAA está regulada por la retroalimentación negativa que lleva a cabo el AT1-R sobre las células del aparato yuxtaglomerular, donde se inhibe la liberación de renina a la sangre.¹²¹ Al bloquear la acción de la ECA y los receptores AT1-R se interrumpe la retroalimentación negativa y en consecuencia se estimula la liberación de renina activa al torrente sanguíneo, lo que vuelve a elevar los niveles de AngI y, en consecuencia, a activar de nuevo el SRAA.²³⁵

4.2.- Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas en la inhibición del SRAA

Se estima que el control de la presión arterial continúa siendo inadecuado en casi la mitad de pacientes hipertensos debido a la baja adherencia al tratamiento o a la ineficacia de los fármacos.^{236,237} Existe por tanto una parte de la población general de pacientes hipertensos que desarrollan hipertensión arterial resistente, definiéndose esta como la condición en la que la presión arterial se encuentra por encima de 140/90 mmHg a pesar de la toma de 3 o más fármacos, incluido un diurético, en las dosis apropiadas.²³⁸ Se estima que entre un 10% y un 15% de la población general hipertensa tiene hipertensión arterial resistente, lo que implica un incremento en la mortalidad y

una mayor tasa de órganos diana afectados con respecto al resto de pacientes hipertensos.^{239,240} Actualmente existen 69 fármacos agrupados en 15 clases diferentes dirigidos al tratamiento de la hipertensión arterial, sin embargo, el hecho de que exista una población de pacientes que desarrollan hipertensión arterial resistente y que los fármacos disponibles ocasionen efectos adversos o sean incapaces de bloquear completamente el SRAA contribuye a la constante búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos y dianas terapéuticas para la hipertensión arterial.²²⁹

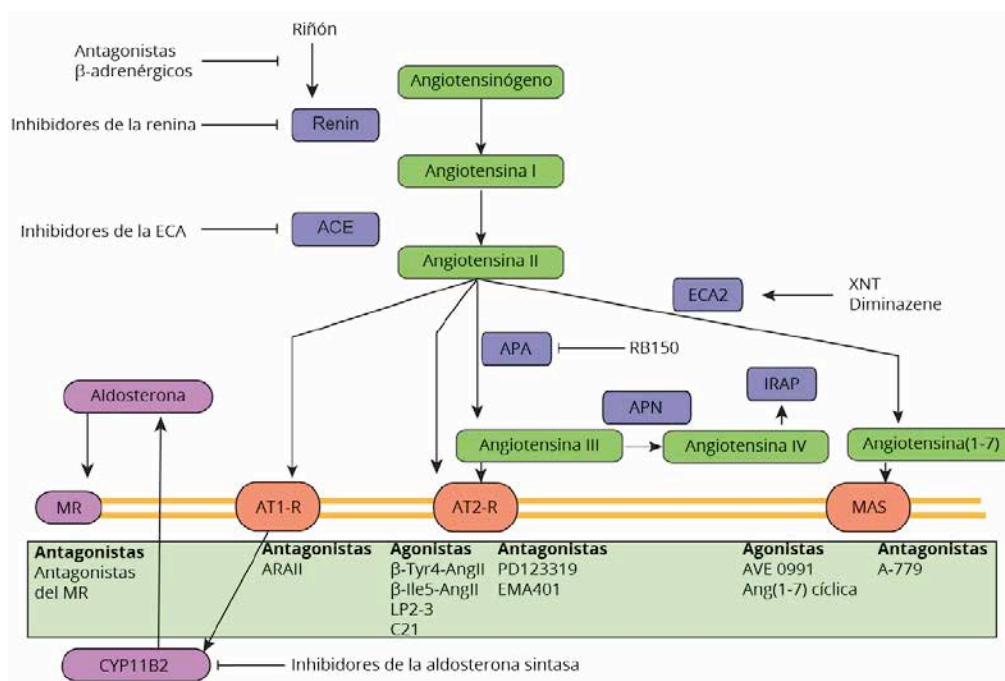


Figura 16: Inhibición farmacológica del SRAA. El bloqueo del SRAA por fármacos se ha enfocado al bloqueo de la renina, la ECA, los receptores de angiotensina de tipo 1 o el receptor de mineralocorticoide mediante el uso de inhibidores de la renina, inhibidores de la ECA, antagonistas de los AT1-R y del MR, respectivamente. Los nuevos inhibidores enzimáticos están dirigidos al bloqueo de la aminopeptidasa A (APA), la cual genera la AngIII (Ang(2-8) a partir de la AngII (Ang(1-8)) o la inhibición de la aldosterona sintasa (CYP11B2). También se están desarrollando agonistas del receptor de angiotensina AT2-R y el receptor Mas.¹²¹

En los últimos años se han identificado componentes del SRAA que desempeñan una función de regulación opuesta al SRAA clásico y se han intentado utilizar como diana terapéutica en la regulación de la presión arterial.²⁴¹⁻²⁴³ La ECA2 convierte la AngI en Ang(1-9) y la AngII en Ang(1-7), esta última ha sido estudiada en profundidad en los últimos años debido a su capacidad para unirse al receptor Mas acoplado a proteínas G y desencadenar una cascada de señalización que conduce a un aumento de la vasodilatación, reducción del estrés oxidativo, y posee efectos antihipertróficos y antifibróticos.²⁴³ Además, la ECA también media en la degradación de la AngII, lo que

contribuye a aumentar los efectos antihipertensivos y vasoprotectores de esta vía.²⁴³ El interés en la vía ECA2/Ang(1-7)/Mas como diana terapéutica ha conducido a la síntesis de moléculas como XNT y DIZE, que actúan activando la ECA2 y produciendo un descenso en la presión sanguínea, mejoran la función del miocardio y son capaces de revertir la fibrosis miocárdica y perivascular en ratas espontáneamente hipertensas.^{244,245} Sin embargo, la administración en pacientes de la Ang(1-7) ha demostrado ser ineficaz debido a su corta vida media *in vivo*,^{246,247} por lo que la investigación se ha centrado en el estudio de agonistas del receptor Mas^{248,248} y en análogos de la Ang(1-7) como la alamandina, un péptido aislado en plasma humano y corazón de rata que es idéntico a la Ang(1-7), salvo en el primer aminoácido del extremo N-terminal y que ejerce su actividad a través de un receptor distinto, que ha demostrado tener efectos antihipertensivos y antifibróticos similares a los de la Ang(1-7)²⁴⁹ (Figura 16).

5.- Inhibición directa de la renina: Aliskiren

La renina es el paso inicial y limitante del SRAA, que representa la diana terapéutica más lógica y apropiada para la inhibición del SRAA.²⁵⁰ El bloqueo farmacológico de la renina ha sido objeto de estudio desde hace años y el resultado de esta búsqueda fue el primer inhibidor de la renina: la pepstatina, un inhibidor inespecífico de las proteasas ácidas de origen microbiano y con la capacidad de bloquear la reacción de la renina con el angiotensinógeno para formar la AngI.^{251,252} Sin embargo, la pepstatina era un inhibidor débil de la renina con baja solubilidad.^{251,252} Mas tarde se desarrolló la primera generación de inhibidores de la renina, consistente en dos grupos de péptidos análogos del prosegmento de la renina²⁵³ y con una elevada efectividad en el bloqueo de esta pero muy baja biodisponibilidad, motivo por el cual se que hacía necesaria su administración por vía parenteral, lo que propició la llegada de la segunda generación de inhibidores consistente en péptidos más potentes y estables, mejorando las propiedades farmacocinéticas de sus predecesores.¹⁰³ A esta familia pertenecen los fármacos orales enalkiren, remikiren y zankiren.¹⁰³ Sin embargo, su uso clínico era limitado debido a su baja biodisponibilidad (baja absorción y rápida metabolización) y débil actividad antihipertensiva.¹⁰³

5.1.- Propiedades farmacológicas y efecto antihipertensivo del aliskiren

El aliskiren es una octanamida (Figura 17) de bajo peso molecular que presenta una alta especificidad por el centro activo de la renina, siendo su afinidad de unión a esta 10.000 veces mayor que a otras aspartil proteasas, como la catepsina D o la pepsina, de forma que sus efectos adversos son reducidos.²⁵⁰ Tras su administración oral en voluntarios sanos en un rango de dosis comprendida entre 40 y 640 mg/día, la concentración plasmática de aliskiren aumenta de forma dosis-dependiente, alcanzando su pico máximo de concentración en plasma tras 3-6 horas después de su administración, y siendo su vida media en plasma entre 20 y 40 horas, lo que lo hace adecuado para una administración en forma de monodosis diaria.²⁵⁰

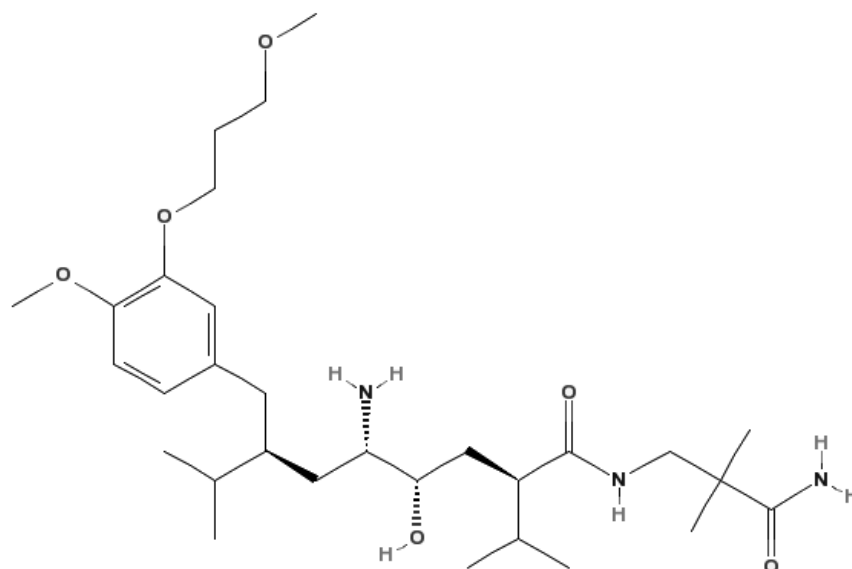


Figura 17: Aliskiren: 2(S),4(S),5(S),7(S)-N-(2-carbamoyl-2-methylpropyl)-5-amino-4-hydroxy-2,7-diisopropyl-8-[4-methoxy-3-(3-methoxypropoxy)-phenyl]-octanamide).²⁵⁴

La biodisponibilidad oral de aliskiren es limitada (2.7%), sin embargo esto se ve compensado por su alta especificidad por el centro activo de la renina, su rápida acumulación en sangre y su larga vida media (debido a su bajo metabolismo y excreción).²⁵⁰ La eliminación del aliskiren se da principalmente a través de secreción biliar como producto no metabolizado, y no afecta significativamente al metabolismo oxidativo del citocromo P450, lo que le otorga un bajo potencial de interacción con otros fármacos como la warfarina (anticoagulante), lovastatina (estatina), digoxina

(antiarritmico), valsartan (ARAII), amlodipino (Ca^{+2} -antagonista), metformina (antidiabético), atenolol (β -bloqueante), ramipril (IECA) y hidroclorotiazida (diurético), haciéndolo ideal para el tratamiento combinado.²⁵⁵

La inhibición de la renina por aliskiren sucede debido a la unión mediante puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y amino centrales de la molécula de aliskiren con los residuos Asp32 y Asp215 del centro activo de la molécula de renina.¹⁵¹ En consecuencia, el aliskiren bloquea el acceso del angiotensinógeno al centro activo de la renina e impide su conversión proteolítica a AngI¹⁵¹ (Figura 18).

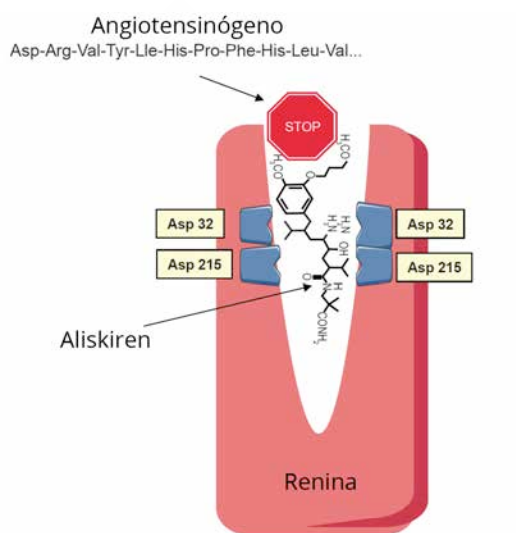


Figura 18: Bloqueo del centro activo de la renina por el aliskiren.¹⁵¹

En trabajos llevados a cabo en mastocitos humanos y plasma de voluntarios sanos a los que previamente se le había administrado aliskiren en un rango de dosis entre 75 y 600 mg, se pudo observar que el aliskiren tiene la capacidad de unirse a la renina acumulada en los gránulos de secreción de las células yuxtaglomerulares, y a su vez puede unirse a la pro-renina circulante en plasma.²⁵⁶ Además, se comprobó que el aumento en la renina plasmática observado tras el tratamiento con aliskiren era provocado por la activación de la pro-renina que se activaba de forma no proteolítica.²⁵⁶ La unión del aliskiren a la renina almacenada en las células yuxtaglomerulares implica que el aliskiren tiene la capacidad de inhibir la actividad enzimática de la renina incluso antes de su liberación a la circulación sanguínea y, a su vez, el efecto del aliskiren puede perdurar incluso cuando sus niveles plasmáticos son bajos.²⁵⁶

El tratamiento con aliskiren en monoterapia reduce significativamente los niveles de presión arterial, y su efectividad es similar a la de los IECAs o los ARAII, sin verse afectada por el sexo o edad de los pacientes.²⁵⁷ Aunque se han propuesto varias explicaciones para el hecho de que los valores de presión arterial no decrezcan más con la inhibición de la principal enzima desencadenante del SRAA, la más sencilla es que el SRAA no es la única vía de regulación que contribuye a la hipertensión arterial, y que pueden existir mecanismos compensatorios ante el tratamiento con aliskiren.²⁵⁸ Además, existen limitaciones en las dosis de aliskiren, ya que a dosis superiores a 300 mg el efecto en la bajada de la presión arterial se estanca y aumenta la aparición de efectos adversos.²⁵⁸

Diversos estudios clínicos han demostrado una mayor efectividad en la combinación terapéutica de aliskiren con calcio-antagonistas, diuréticos, IECAs o ARAII en el tratamiento de la hipertensión arterial frente a la monoterapia.^{259,260} Sin embargo, el estudio ALTITUDE (Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardio-Renal Endpoints), en el que se investigaba los efectos del aliskiren combinado con IECAs y ARAII en pacientes con diabetes mellitus de tipo II y alto riesgo cardiovascular y renal, fue suspendido de forma prematura al observarse en los pacientes que recibieron el aliskiren un mayor número de efectos adversos como el infarto, insuficiencia renal, hiperpotasemia o hipotensión, con respecto a los pacientes que habían recibido el placebo.²⁵⁹ Estos resultados sugieren que la terapia combinada de aliskiren y otros inhibidores del SRAA puede incrementar los efectos adversos y debe ser evitada en pacientes de alto riesgo como los diabéticos, los que presentan fallo renal o insuficiencia cardíaca.²⁵⁹

5.2.- Efectos del aliskiren a nivel cardiovascular

Se han llevado a cabo numerosos estudios para evaluar los efectos cardioprotectores del aliskiren tanto en monoterapia como terapia combinada con otros inhibidores del SRAA.²⁵⁰ El estudio ALLAY (Aliskiren in Left-Ventricular Hypertrophy Study) se llevó a cabo en 465 pacientes obesos con hipertensión primaria e hipertrofia del ventrículo izquierdo, y se comprobó que tanto el aliskiren como el ARAII losartan tenían efectos comparables en la regresión de la hipertrofia del ventrículo izquierdo y la disminución de la presión arterial.²⁶¹ En el estudio ALOFT (Aliskiren Observation of Heart Failure Treatment) se compararon los efectos del aliskiren frente al placebo sobre las

concentraciones en suero del péptido natriurético cerebral (BNP) (de utilidad en la detección y diagnóstico de la insuficiencia cardiaca) en pacientes con insuficiencia cardiaca.²⁶² Después de 3 meses de tratamiento se observó que el aliskiren disminuía de forma significativa la concentración de BNP, la prohormona N-terminal del péptido natriurético cerebral (NT-proBNP) (fragmento N-terminal del BNP de utilidad en la detección y diagnóstico de la insuficiencia cardiaca) y la aldosterona.²⁶² En la actualidad, debido en parte a los resultados del estudio ALTITUDE, a la falta de ensayos clínicos adecuados a largo plazo y su coste superior al de otros fármacos antihipertensivos, el aliskiren permanece sin ser incluido en las principales guías clínicas como terapia de primera elección frente a la hipertensión, aunque ha demostrado ser eficaz en la disminución de la presión sanguínea y poseer un efecto positivo frente al daño inducido por la hipertensión arterial en órganos diana.²⁶³

Sin embargo, el aliskiren sigue siendo objeto de estudio, tanto en pacientes como en ensayos *in vitro* o en modelos de experimentación animal, gracias a los potenciales efectos que aporta en la protección de los órganos diana de la hipertensión arterial y de forma más específica a nivel cardiovascular.²⁶³ A nivel del endotelio vascular el aliskiren parece ejercer efectos beneficios, puesto que, en trabajos llevados a cabo con ratones en los que se había anulado la expresión de la apolipoproteína E (el defecto en su producción ocasiona trastornos lipídicos que causan un incremento continuo de colesterol y triglicéridos en sangre) el tratamiento con aliskiren ha demostrado reducir el área de la placa aterosclerótica, la neovascularización de las lesiones ateroscleróticas, la inflamación vascular y la degradación de la matriz extracelular, provocando una regresión en el avance de la aterosclerosis.^{264,265} Además, en experimentos realizados en ratas espontáneamente hipertensas el aliskiren no solo mejoró la presión arterial sino que fue capaz de inducir la relajación dependiente del endotelio de la aorta torácica, mediante la atenuación del estrés oxidativo y la activación de la ruta de señalización fosfoinositol 3 quinasa/Proteína quinasa B/eNOS (PI3K/AKT/eNOS).²⁶⁶ Estos efectos beneficiosos a nivel del endotelio también se han observado en pacientes hipertensos tratados con aliskiren en los que se ha encontrado una mejora en el remodelado vascular en la circulación de la retina,²⁶⁷ y en pacientes hipertensos con diabetes mellitus de tipo II en los que se ha observado un efecto favorable en la función endotelial mediante la reducción de la rigidez arterial y el aumento de células progenitoras endoteliales en la circulación.²⁶⁸

A nivel del corazón, se ha observado que el aliskiren disminuye el daño inducido por isquemia/reperfusión en el miocardio en ratas, efecto que estaría mediado a través del receptor de bradiquinina B2 y el receptor de angiotensina AT2-R.²⁶⁹ Zhang y colaboradores en el año 2014 demostraron que el tratamiento con aliskiren en ratas espontáneamente hipertensas contribuía a minimizar el daño miocárdico provocado por isquemia/reperfusión mediante la activación de la ruta de señalización PI3K/AKT/eNOS y la disminución del estrés oxidativo, lo que contribuye a reforzar el posible papel cardioprotector del aliskiren.²⁷⁰ Además, existen estudios *in vivo* llevados a cabo en ratones e *in vitro* desarrollados en fibroblastos cardíacos de rata en los que el tratamiento con aliskiren demostró ejercer efectos directos antifibróticos en el miocardio, inhibiendo el desarrollo de la hipertrofia en el corazón y mejorando la disfunción cardíaca.^{271,272} Finalmente, se ha observado en ratas espontáneamente hipertensas que el aliskiren induce un descenso en la autofagia y aumenta la expresión de la conexina 43 (canal que conecta directamente el citoplasma de células adyacentes y que parece desempeñar un papel importante en procesos que median la autofagia y la apoptosis) a nivel del miocardio, por lo que el aliskiren parece poseer un efecto protector en el músculo cardíaco frente a la apoptosis.²⁷³

5.3.- Aliskiren, síndrome metabólico e inflamación

Existen numerosos estudios llevados a cabo en humanos y modelos animales en los que se sugiere un efecto beneficioso del aliskiren sobre algunos de los componentes del síndrome metabólico como la resistencia a la insulina o la inflamación a nivel sistémico.^{254,263} En trabajos realizados tanto en humanos como en ratas con una dieta alta en fructosa se ha observado que el tratamiento con aliskiren mejora la sensibilidad a la insulina debido al descenso en la formación de AngII.^{274,275} Chou y colaboradores demostraron en 2011 que una dieta crónica alta en fructosa induce en ratas hipertensión, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, hiperglucemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, y que el aliskiren puede prevenir o revertir todas esas alteraciones a una dosis diaria de 100mg/kg durante un período de 4 a 8 semanas.²⁷⁵ Además, en experimentos llevados a cabo con ratones el aliskiren ha demostrado reducir la adiposidad y ganancia de peso tras una dieta alta en grasa, así como reducir los niveles plasmáticos de la adipokina leptina.²⁷⁶ En estudios llevados a cabo con ratas diabéticas, la administración de aliskiren disminuye la inflamación a nivel sistémico mediante la mejora del metabolismo, estrés oxidativo, perfil lipídico y los

niveles de adiponectina, así como mediante un descenso en los niveles de TNF- α en suero.²⁷⁷ Además, también se ha podido comprobar en trabajos llevados a cabo en modelos murinos de nefropatía diabética, que el tratamiento con aliskiren atenúa de forma significativa los efectos de la diabetes a nivel renal como la glomeruloesclerosis (formación de tejido cicatricial en el glomérulo) y una mejora de la albuminuria.²⁷⁸

En estudios llevados a cabo en ratones con una dieta alta en grasa, el tratamiento con aliskiren ha demostrado atenuar la esteatosis hepática mediante la disminución de los niveles del receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ (PPAR γ) (a nivel hepático regula la lipogénesis, encontrándose su expresión aumentada en la esteatosis hepática), incrementando la expresión del citocromo P450, la carnitina palmitoiltransferasa 1A (CPT1a), la sensibilidad a la insulina y el transporte de glucosa en músculo esquelético mediante la fosforilación del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1) y AKT.²⁷⁹ Además, el aliskiren también ha demostrado efectos protectores frente a la hepatotoxicidad inducida por el paracetamol en las células hepáticas de rata, mediante la disminución del estrés oxidativo y la producción de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α .²⁸⁰ La correcta oxigenación del tejido renal puede desempeñar un papel importante en la progresión de las enfermedades renales y el aliskiren ha demostrado mejorar la oxigenación de este tejido en pacientes hipertensos, lo que podría contribuir a explicar el efecto renoprotector de los inhibidores del SRAA.²⁸¹

A nivel inflamatorio, se ha propuesto que el aliskiren como una molécula antiinflamatoria por los efectos beneficiosos que ha demostrado en la reducción del estrés oxidativo y la síntesis de moléculas proinflamatorias, así como en la mejora observada en órganos diana afectados.²⁸²⁻²⁸⁴ El aliskiren ha resultado ser efectivo en la disminución del estrés oxidativo y recuperar la sensibilidad barorrefleja (cambios reflejos del ritmo cardíaco ante cambios en la presión arterial) en modelos animales de hipertensión renal.²⁸⁵ Además, el aliskiren también ha demostrado ser efectivo en la reducción del daño inducido por isquemia/reperfusión en ovario de rata a través de la reducción del estrés oxidativo y la inflamación,²⁸⁶ y a nivel pulmonar ha demostrado reducir la fibrosis en ratas y ratones, no solo atenuando el estrés oxidativo, sino también mediante la disminución de la expresión de proteínas implicadas en el crecimiento y proliferación celular como la metaloproteína de matriz 9 (MMP-9) y el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1).^{282,287}



OBJETIVOS

ALISKIREN



Se ha sugerido que el aliskiren podría ser una molécula antiinflamatoria con efectos en órganos diana de la hipertensión arterial. Es por ello que los objetivos principales planteados en este trabajo de tesis han sido:

- 1.- Determinar los efectos del aliskiren sobre la viabilidad de cardiomiocitos en cultivo.
- 2.- Determinar los efectos del aliskiren sobre el metabolismo de cardiomiocitos en cultivo.







MATERIAL Y MÉTODOS

ALISKIREN



Todos los reactivos utilizados, salvo que se especifique lo contrario, han sido suministrados por Sigma-Aldrich (US).

En los experimentos realizados en este trabajo se utilizaron concentraciones de aliskiren en un rango de dosis similares a las descritas y utilizadas en estudios previos sobre el efecto del aliskiren a nivel celular, y similares a las halladas en plasma humano.^{288–293}

1.- Ética

La adquisición de tejido humano se llevó a cabo previo consentimiento informado de los pacientes, de acuerdo con la Declaración de Helsinki 2008, la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, la Convención Europea de los Derechos Humanos y Biomedicina (ETS 164) y la Ley de Tejidos Humanos de 2004 (UK), tras la aprobación por parte del Comité Ético de Investigación Clínica de la Xunta de Galicia. Para los experimentos *in vivo* con ratas, se utilizaron las instalaciones del animalario de la Facultade de Medicina de la Universidade de Santiago de Compostela (USC), siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki, las regulaciones del Comité Bioético de la USC y las directrices de la directiva 2010/63 de la Unión Europea. Los experimentos fueron llevados a cabo según la normativa legal vigente de experimentación animal y según la Ley 32/2007 del 7 de noviembre para el cuidado de animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, y por la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio auspiciada por el NIH (National Institutes of Health, US) y el NRC (National Research Council, US), por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y fines científicos.

2.- Cultivos Celulares

2.1.- Cultivo de cardiomiocitos adultos humanos

Se utilizaron cardiomiocitos adultos humanos (PromoCell GmbH, DE), cultivados según las instrucciones del fabricante.

2.2.- Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata

En el cultivo de cardiomiocitos neonatales de rata se utilizaron neonatos de ratas Sprague Dawley de hasta 72 horas de vida como máximo. Los cardiomiocitos presentan un número fijo de divisiones durante el desarrollo embrionario y fetal tras el cual entran en estado postmitótico.²⁹⁴ Durante las primeras 48 horas de vida de los neonatos, los cardiomiocitos todavía conservan en parte la capacidad de proliferar,²⁹⁴ por lo que tras la siembra se pueden dividir una o dos veces.

Después de su extracción, los corazones se trocearon en tres o cuatro porciones y se mantuvieron en la solución tampón ADS (6.8 g/L de NaCl, 4.76 g/L de HEPES, 0.12 g/L de NaH₂PO₄, 1.0 g/L de glucosa, 0.4 g/L de KCl, 0.1 g/L de MgSO₄ y 0.02 g/L de rojo fenol, a pH 7.4) hasta su digestión. Las digestiones fueron llevadas a cabo con la siguiente solución enzimática: 80 unidades/mL de colagenasa tipo Ia y 0.6 mg/mL de pancreatina. Se realizaron 5 digestiones a 37°C en agitación. La primera de 30 minutos se desechó, mientras que las cuatro siguientes se recogieron y se incubaron durante 20 minutos. El volumen utilizado de solución enzimática se ajustó según el número de neonatos, manteniendo la proporción de 6 mL/digestión por cada 14 corazones. A cada una de las digestiones se le añadió un 10% de NCS (Newborn Calf Serum) (Merck Millipore, DE) y se centrifugó a 2 000 g durante 5 minutos. El número total de células obtenido se resuspendió en medio de cultivo (66% de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Lonza, CH), 17% de medio M199, 10% de FBS (Fetal Bovine Serum) (Life Technologies, US), 5% de NCS, 1% de penicilina/estreptomicina (Cámbrex, USA) y 1% de L-glutamina)) y se realizó una siembra diferencial durante 2-3 horas sobre superficies de cultivo no tratadas con matriz extracelular, con el fin de aumentar la pureza del cultivo, dejando sedimentar los fibroblastos para posteriormente desecharlos. Se recogió la suspensión celular de cardiomiocitos y se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos.

Las células obtenidas se sembraron con una densidad de 50.000 células/cm² en placas de cultivo previamente tratadas durante 24 horas con una matriz extracelular de fibronectina/gelatina. El medio de cultivo se suplementó con arabinósido de citosina (AraC) (Pfizer, US) a una dosis de 10 µM para inhibir la proliferación de los fibroblastos. El medio se renovó cada 24 horas.

Con esta técnica conseguimos un grado de pureza de cardiomiocitos del 90-99% (comprobado mediante la técnica de inmunohistoquímica para la cadena pesada de la miosina), con un rendimiento de aproximadamente 10^7 células por cada 40 neonatos. Para realizar los experimentos se retiró previamente el suero del medio de cultivo (2-12 horas).

2.3.- Cardiomiocitos auriculares adultos de ratón: línea celular HL-1

La línea celular de cardiomiocitos de ratón HL-1 fue donada por el Dr. William C. Claycomb (Louisiana S.U., Medical Centre, New Orleans, US) y por el Dr. David Sanz Rosa (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, ES). Esta línea celular deriva de la línea celular AT-1 de cardiomiocitos auriculares adultos de ratón pertenecientes a la cepa C57BL/6J.²⁹⁵ Las características de esta línea hacen que sea un buen modelo para el estudio del funcionamiento de los cardiomiocitos a nivel celular y molecular, puesto que, son capaces de multiplicarse conservando el fenotipo específico de las células cardíacas adultas: expresión de la cadena pesada de miosina, de α -actina cardíaca y de conexina 43, además del mantenimiento de la actividad contráctil.²⁹⁵

La línea celular HL-1 fue cultivada sobre superficies de cultivo previamente tratadas con matriz extracelular de fibronectina/gelatina durante 24 horas. Se sembraron con una densidad de 50 000 células/cm². Las células se mantuvieron en medio Claycomb suplementado con 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina (Lonza, CH) y 1% de L-glutamina (Lonza, CH). El medio de cultivo se renovó cada 24 horas. Para el mantenimiento de la línea, cuando las células alcanzaron el 90% de confluencia, se incubaron con tripsina-EDTA (Lonza, CH) durante 3-5 minutos a 37°C. La tripsina se inactivó con DMEM con un 10% de FBS y las células se centrifugaron a 2000 g durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en el medio de cultivo Claycomb suplementado realizando un pase 1:3.

Para realizar los experimentos se retiró previamente el suero del medio de cultivo (2-12 horas).

3.- Ensayo de actividad mitocondrial: MTT

Este ensayo es un sistema simple, preciso y reproducible para medir la actividad de células vivas a través de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial. El 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) es una sal que disuelta en medios de cultivo sin la presencia de rojo fenol o en soluciones tampón es de color amarillo.²⁹⁶ Las células vivas son capaces de captar este compuesto del medio y metabolizarlo en las mitocondrias. Las deshidrogenasas mitocondriales eliminan el anillo de tetrazolio produciendo un cambio de color amarillo a púrpura en el compuesto. Este cambio de color puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 550 nm, de forma que un aumento en el número de células vivas supone un aumento en la cantidad de MTT metabolizado por las deshidrogenasas mitocondriales.²⁹⁶

Mediante esta técnica se procedió a comprobar si el aliskiren afecta a la actividad mitocondrial de los cardiomiocitos en cultivo. Se utilizaron cardiomiocitos de la línea celular HL-1, previamente privados de suero durante 12 horas, tratados con aliskiren (cedido por Novartis Pharmaceuticals, ES) en un rango de dosis de 0.001-50 μ M, tomando como referencia estudios previos,^{289,290} durante 24 y 48 horas y utilizando como control positivo medio de cultivo completo. Cuatro horas antes de finalizar el tratamiento se añadió el reactivo MTT (Thermo Scientific, US) a una concentración de 0,5 μ g/ μ L. Para estimar la cantidad de MTT metabolizado de forma precisa se lisaron las células con un volumen de agente solubilizante (0,0837% de HCl al 37% y SDS al 10%) y se determinó la absorbancia a 550 nm tras 6-24 horas en el lector de ELISA Multiskan®EX (Thermo Scientific, US).

4.- Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo

Este ensayo fue utilizado para determinar el posible efecto del aliskiren sobre el ciclo celular y la viabilidad celular. Para ello se utilizaron cardiomiocitos de la línea celular HL-1, previamente privados de suero durante 12 horas, tratados con aliskiren en un rango de dosis de 1-50 μ M y durante 24 horas. Finalizado el tratamiento, las células se lavaron con PBS y se les añadió tripsina-EDTA durante 3-5 min a 37°C. Tras la incubación, se añadió PBS frío para inactivar la tripsina, se recogieron las células y se centrifugaron a 2000 g durante 5 minutos. Se resuspendieron las células sedimentadas

en paraformaldehído al 4% en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente para su permeabilización y fijación. Se realizó un lavado con PBS y se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos. Las células sedimentadas se resuspendieron en etanol al 70% y se conservaron a -20°C durante 12 horas para su fijación. Se volvieron a realizar dos lavados con PBS y se resuspendieron las células sedimentadas en 1 mg/mL de ribonucleasa A y 40 µg/mL de yoduro de propidio en PBS. El yoduro de propidio es un fluorocromo que se intercala en el ADN, lo que permite determinar la cantidad de ADN presente en la célula y clasificar las fases del ciclo celular y el número de células muertas. Es necesario incubar las células con el yoduro de propidio durante 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. A continuación se analizaron las células mediante citometría de flujo en un citómetro FACS Aria (Becton & Dickinson, US) y con el programa FACSDiva (Becton & Dickinson, US). La tinción con yoduro de propidio analizada por citometría de flujo permite también la caracterización de la distribución celular en cada fase del ciclo: G₀/G₁, S, G₂/M, a través de la medición del contenido de ADN nuclear. La muerte celular implica la degradación del ADN, y, por lo tanto, las células muertas exhiben un contenido de ADN menor a 2n. Dichas células son detectadas en la región subG₀/G₁ o hipodiploide del histograma.

5.- Ensayo de captación de ácidos grasos: BODIPY®

Este ensayo permite medir la capacidad celular para incorporar ácidos grasos de cadena larga. El BODIPY® (4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) es un fluoróforo compuesto por el dipirometano unido a un átomo de boro y este a su vez a dos de fluor. Es un fluoróforo lipofílico, por lo que las sondas que incorporen este compuesto presentan propiedades similares a los lípidos naturales, permitiendo mimetizar el transporte y metabolismo de ácidos grasos en la célula. Se utilizaron células de cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata y la línea celular HL-1, previamente privadas de suero durante 12 horas, tratadas con aliskiren 1-50 µM durante 120 minutos o 30 minutos respectivamente, utilizando como control positivo insulina 100 nM. Al finalizar el tratamiento se lavaron las células con PBS a temperatura ambiente y se añadió BODIPY® 500/510 C₁, C₁₂ (Thermo Scientific, US) 10 µM y seroalbúmina bovina libre de ácidos grasos (BSA-FFA) 20 µM en PBS durante 30 segundos, tras lo cual, se lavó rápidamente con BSA-FFA al 0,1% en PBS frío para eliminar los restos de

ácidos grasos que quedan fuera de las células. Se añadió tripsina-EDTA durante 3-5 minutos a 37°C para recoger las células y se inactivó con PBS frío. Se centrifugaron las células a 1.500 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron las células sedimentadas en yoduro de propidio 1 μ M en PBS para descartar las células muertas. Se incubaron las células con el yoduro de propidio durante 15 minutos en oscuridad y se procedió a medir la fluorescencia de cada muestra mediante citometría de flujo utilizando un citómetro FACScalibur (Becton & Dickinson, US).

6.- Inmunocitoquímica y microscopía confocal

Mediante el uso de microscopía confocal se estudió la posible movilización de los transportadores de ácidos grasos CD-36 y los transportadores de glucosa Glut-4 hacia la membrana plasmática tras el tratamiento de cardiomiocitos con aliskiren. Para ello se sembraron cardiomiocitos neonatales de rata en cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro y cardiomiocitos adultos humanos en portaobjetos Lab-TekIII Chamber Slides (Nunc, DK), previamente tratados con fibronectina.

Los cardiomiocitos neonatales de rata y adultos humanos se privaron de suero durante 12 horas y se trataron con dosis de aliskiren de 10 o 50 μ M durante 15 o 30 minutos. Una vez finalizado el tiempo de tratamiento se realizaron tres lavados con PBS y se fijaron las muestras con paraformaldehído al 4% (Thermo Scientific, US) en PBS a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación se bloqueó y permeabilizó la membrana celular con un 0,2% de Tween-20, 5% de suero de cabra y un 0,2% de BSA en PBS (PBT-T) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se diluyeron en PBT-T: anti-CD-36 (Abcam, UK) a una concentración 1:100 y anti-GLUT-4 (Abcam, UK) a una concentración 1:100, y se incubaron según las instrucciones del fabricante. Se lavaron 3 veces las muestras con PBS durante 20 minutos y se añadió el anticuerpo secundario fluorescente en PBT-T, utilizando donkey anti-rabbit IgG Cy3-conjugated (Jackson ImmunoResearch, US) a una concentración 1:1500 durante 45 minutos a 37 °C en oscuridad. Se repitieron los lavados con PBS y se realizó una incubación con TO-PRO 3 (Life Technologies, US) a una concentración de 1:500 en PBT-T durante 10 minutos en oscuridad. El TO-PRO 3 es un colorante fluorescente que entra de forma pasiva en el interior celular y se intercala en el ADN de

doble cadena marcando los núcleos celulares. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos y se montaron sobre los portaobjetos utilizando una mezcla de Mowiol (Calbiochem, US), glicerol, Tris-HCl y 2.5% DABCO anti-fading agent (DABCO, DK), que presenta el mismo índice de refracción que el aceite de inmersión y protege frente a la pérdida de fluorescencia de la muestra. Después de 12 horas a 4°C se analizaron las muestras utilizando el microscopio Leica DMIRE2 (Leica Microsystems, DE). El análisis y cuantificación de las imágenes se realizó con el programa ImageJ (NIH, US) utilizando una proyección en Z y representando la fluorescencia media.

Los controles de la técnica utilizados fueron los siguientes:

- Control de autofluorescencia de las células: se procesó sólo con PBT-T.
- Control de inespecificidad del anticuerpo secundario: se procesó con PBT-T sin anticuerpo primario, y se le añadió sólo el anticuerpo secundario y el marcador de núcleos.

Para la cuantificación de la movilización del transportador de ácidos grasos CD-36 y el transportador de glucosa Glut-4, se seleccionó en cada punto de tratamiento (en duplicados) un mínimo de 6 campos visuales elegidos de forma aleatoria y se realizaron seis contajes en cada campo visual. Se determinaron regiones de interés de un tamaño fijo para cuantificar la fluorescencia de las regiones citoplasmáticas perinucleares y las regiones citoplasmáticas periféricas cercanas a la membrana plasmática dentro de cada célula, seleccionando las células de forma aleatoria dentro del campo visual y evitando cuantificar las células atípicamente largas o demasiado pequeñas, las células que no estén en contacto con al menos otra célula o las células con bordes citoplasmáticos atípicos o no diferenciados de las células vecinas. Se consideró un incremento en la expresión de CD-36 en el sarcoplasma/membrana plasmática en cualquier célula que contuviese una región de al menos 1/4 de su área total con una intensidad de fluorescencia por encima del valor medio de todas las células control. Para Glut-4, cuya expresión plasmática es relativamente más homogénea que la de CD-36, los cambios en su distribución entre los compartimentos núcleo/membrana nuclear y citoplasma/membrana plasmática se determinaron como se ha descrito previamente.²⁹⁷ Las cuantificaciones se realizaron por duplicado, por dos observadores independientes y expresada como porcentajes de células con la distribución de CD-36 o Glut-4 alterada.

7.- Array de expresión de genoma completo: GeneChip® Affymetrix®

Utilizando la tecnología GeneChip® de Affymetrix® se llevó a cabo el análisis de expresión génica, realizado por Progenika Biopharma S.A. (ES) mediante el array de expresión de genoma completo RatGene 1.0 ST. Tanto el procesamiento de las muestras como la hibridación, revelado, escaneado de los chips y análisis de los resultados se realizaron siguiendo los protocolos y equipos oficialmente recomendados por Affymetrix Inc (US).

Para realizar el ensayo, se utilizaron cardiomiocitos neonatales de rata, previamente privados de suero durante 12 horas y tratados durante 3 horas con aliskiren a una concentración de 50 μ M. Se realizó la extracción de ARN, se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1.000 (Thermo Scientific, US).

A partir del ARN total obtenido, se estimó la cantidad, calidad e integridad del mismo mediante el análisis de una muestra en el sistema Bioanalyzer (Agilent Technologies, US) y su medida espectrofotométrica utilizando el NanoDrop® ND-1.000 (Thermo Scientific, US). A partir de 300 ng de cada una de las muestras, se sintetizó ADNc con el WT Expression kit de Ambion, siguiendo el protocolo de The Ambion WT Expression kit for Affymetrix GeneChip Whole Transcript (WT) Expression Arrays. El proceso consiste en la síntesis de ADNc utilizando “*random primers*” que incorporan el promotor de T7 y en la transcripción in vitro de este ADNc para generar un ARNc a partir del cual sintetizar de nuevo ADNc en el que se incorpora dUTP. El ADNc así sintetizado se fragmenta utilizando UDG (Uracil DNA Glycosylase) y APE1 (Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1). El ADNc fragmentado se marca con transferasa terminal utilizando el Affymetrix GeneChip WT Terminal Labeling kit y siguiendo el protocolo GeneChip WT Terminal Labeling and Hybridization User Manual, for use with the Ambion WT.

La cantidad de ADNc se cuantificó mediante medida espectrofotométrica en NanoDrop® ND-1.000. La síntesis de ADNc y la correcta fragmentación de los ADNc se comprobó mediante la cuantificación de una muestra en el sistema Bioanalyzer. A continuación se preparó la mezcla de hibridación para el chip RatGene 1.0 ST. Para el procesamiento de los chips se utilizó el programa Affymetrix® GeneChip® Command Console® (AGCC 1.1, Affymetrix®) y Expression Console™ (EC 1.1, Affymetrix®).

8.- Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizó como tampón de lisis el reactivo comercial TRIzol® (Thermo Scientific, US) seguido del sistema de microcentrifugaciones en columna RNeasy Mini Kit (Qiagen, DE). El TRIzol® es una solución monofásica de fenol y el agente caotrópico isocianato de guanidina que, durante la homogenización o lisis de la muestra mantiene la integridad del ARN, al mismo tiempo que disuelve los componentes celulares. La adición de cloroformo seguida de centrifugación separa la muestra en dos fases, una de ellas acuosa y la otra orgánica. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, que se recupera. A continuación utilizamos el sistema de extracción RNeasy® Mini kit (Qiagen, DE). Este sistema representa una tecnología bien estabilizada para la purificación del ARN. Este método combina las propiedades de unión selectivas de membranas basadas en gel de sílice con microcentrifugaciones, de forma que gracias a una solución tampón específica de alta concentración salina permite retener en la membrana hasta 100 µg de ARN de más de 200 pares de bases. El etanol proporciona las condiciones de unión adecuadas del ARN a la columna, donde el ARN total se une a la membrana y los contaminantes se eluyen de forma eficiente mediante distintos lavados.

El proceso de extracción fue llevado a cabo de la siguiente forma: se lavaron con PBS las células y se añadió TRIzol® en función del plato de cultivo (500-1000 µL). Se le añadió cloroformo en proporción TRIzol:cloroformo 5:1 y se centrifugó a 12 000 g durante 15 minutos a 4°C. Se recogió la fase acuosa y se repitió el proceso con la fase recogida. A continuación, se recogió por última vez la fase acuosa y se mezcló con un volumen de etanol de 70°. A partir de este paso se continuó la extracción utilizando las columnas del RNeasy® Mini kit siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ARN se realizó en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, US). Después de su cuantificación, el ARN se almacenó a -80°C.

9.- RT-qPCR

Se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR) para determinar la expresión génica de determinados genes de interés mediante los siguientes métodos:

- Para la validación del array se utilizó el RT² First Strand Kit (Qiagen, DE) y RT² Real-Time™ SYBR Green/Rox PCR master mix (Qiagen, DE), partiendo de 1 µg ARN total para la obtención de ADN complementario (ADNc) se sintetizaron 20 µL de ADNc, utilizando los reactivos y cebadores Oligo dT del RT² First Strand cDNA Kit (Qiagen, DE), siempre según las instrucciones del fabricante y en un termociclador Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, US) con un perfil térmico de 15 minutos a 42°C y 5 minutos a 95°C. La reacción de PCR cuantitativa se realizó a partir de 1 µL de ADNc con el kit RT² Real-Time™ SYBR® Green/Rox PCR Master Mix (Qiagen, DE) siguiendo las instrucciones del fabricante y en un termociclador Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, US) con un perfil térmico de 1 ciclo de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 40 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C, con una lectura de la fluorescencia al final de cada ciclo. Se utilizaron los siguientes cebadores de rata RT² qPCR Primer Assays (Qiagen, DE) a una concentración de 500 nM:

<i>Cebadores</i>	<i>Nº Catalogo</i>	<i>Pares de bases</i>	<i>GenBank</i>
Rrad	PPR06499A	191	NM_053338.1
Insig1	PPR42307A,	103	NM_022392.1
Lpin1	PPR59564A	63	NM_001012111.1
Pdk4	PPR48407A	91	NM_053551.1
Hmgcs1	PPR43438E,	66	NM_017268.1
Lss	PPR44730A,	182	NM_031049.1
Fdft1	PPR43022A,	117	NM_019238.2
Dhcr7	PPR42280A	139	NM_022389.2
Hmgcr	PPR44338A	93	NM_013134.2
Arid5A	PPR46170A	172	NM_001034934.1
Gapdh	PP06557A	172	NM_017008.3

- Para la identificación de los receptores (P)R e Igf/M6P2 se utilizó el Stratagene Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix Kit (Agilent Technologies, US), partiendo de 2,5 ng de ARN. La reacción de RT-PCR se realizó en un solo paso en un Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, US), utilizando cebadores OligodT siguiendo las instrucciones del fabricante de acuerdo al siguiente perfil térmico: 1 ciclo de 30 minutos a 50°C, 1 ciclo de 10 minutos a 95°C, y 40 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 58°C y 1 minuto a 72°C. Como control de amplificación de ADN genómico se realiza un punto sin retrotranscriptasa, y como control negativo se realiza un punto sin

ARN. Se utilizaron los siguientes cebadores sintéticos a una concentración de 500 nM (TIB Molbiol, DE):

<i>Cebadores</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Pares de bases</i>	<i>GenBank</i>
(P)RR de ratón	Sentido: CCCAGCGAGGAGAGAGTGTATATG	172	NM_027439.4
	Antisentido: CGGAGAGAAAGAGCAGGTCAAC		
Igf2/M6PR de ratón	Sentido: CAATGCCTGCCTGTGGAACG	198	NM_010515
	Antisentido: GATGATGAATGCTGTGCCTCTG		
(P)RR de rata	Sentido: GGTCTGACTGCGGTGCTC	109	XM_217592.5
	Antisentido: AGAGAAGAGAGGAGAACGACAAG		
Igf2/M6PR de rata	Sentido: GCCACGAGACTGCTGACTG	154	NM_012756.1
	Antisentido: AGGAGGAGACTGAGGACTGC		

Como control de expresión de ADN genómico se realiza un punto sin retrotranscriptasa, y como control negativo se realiza un punto sin ARN. En los casos necesarios, se realizó un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para observar el producto de amplificación, utilizando el UVP EC3 Imaging System (UVP, US) como sistema de revelado.

10.- Extracción de proteínas

Los cardiomiocitos neonatales de rata y adultos humanos se privaron de suero durante 12 horas y fueron tratados con aliskiren a una concentración de 50 μ M entre 3-6 horas y entre 2-30 minutos (para comprobar el estado de fosforilación de ERK1/2) y en presencia o ausencia de renina recombinante de rata (Anaspec Inc., US) o renina recombinante humana (Anaspec Inc., US), en una concentración de 0.01 μ M durante 5 minutos. Al finalizar el tratamiento se lavaron las células con PBS (Phosphate-buffered saline) frío y después se añadió 6.7 μ L/cm² de tampón de lisado (5% de Tris-Base a 1 M y pH 7.5, 5% de NaCl a 5 M, 30% de Na₄P₂O₇+10H₂O, 1% de EDTA a 0.5 M, 20% de NaF a 5 M, 10% de Triton X-100 al 10%, 1% de Na₃VO₄ a 0.1 M, 1% de PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) a 0.1 M, 1% de aprotinina, 1% de leupeptina y 25% agua ultrapura Milli-Q). Se realizó el lisado de las células a 4°C con ayuda de un

raspador y se recogió el lisado a tubos de centrifuga. El lisado fue homogenizado y mezclado utilizando un agitador de tipo vórtex y, tras 30 minutos de reposo en hielo se centrifugó a 13 000 g durante 15 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se conservó a -40 °C.

11.- Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas en solución se determinó mediante el uso del método de Bradford utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, US). El procedimiento tiene su fundamento en la formación de un complejo entre el colorante Coomassie® Brilliant Blue G-250 y las proteínas, de forma que el complejo proteína-colorante causa el cambio del máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm. El colorante Coomassie se une principalmente a aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente a la arginina. La cantidad de absorción es proporcional a la cantidad de proteínas.

Para calcular la concentración de proteínas de las muestras se utilizó una recta patrón de seroalbúmina bovina (BSA), comprendida entre 2.5 y 25 µg/mL en agua MilliQ y un 20% del reactivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, US). Para la cuantificación de las muestras, se realizó una dilución 1:200 en agua MilliQ. La absorbancia se midió tras 5 minutos de incubación a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 1100 Pro (GE Healthcare Life Sciences, US). Para calcular la concentración de proteína se extrapolaron los valores obtenidos de absorbancia de las muestras en la recta patrón de BSA mediante el uso de una ecuación polinomial de segundo orden o cuadrática, con la que se obtiene una relación más precisa entre concentración y absorbancia.

12.- Western blot

Mediante la técnica de Western blot estudiamos la expresión y activación de determinadas proteínas de interés. A través de una electroforesis en gel de poliacrilamida (30% Acrylamide/Bis Solution, Bio-Rad, US), se separan las proteínas en función de su tamaño. En general, se utilizaron geles al 10% con Tris-Base a 1.5 M con pH 8.8, dodecilsulfato sódico (SDS) al 10%, persulfato amónico (APS) al 10% y

tetrametiletilendiamina (TEMED). Se preparó un gel concentrador sobre el gel separador, que tiene un tamaño de poro más grande. Para el gel concentrador se utilizó un 4% de acrilamida, Tris-Base a 1.5 M con pH 6.8, SDS al 10%, APS al 10% y TEMED a distintas cantidades en función del volumen final de preparación.

Las proteínas se diluyeron en tampón de carga (25% de Tris-Base a 0.5M + 0.4% de SDS con pH 6.8, 20% de glicerol, 4% de SDS, 0.2% de 2-mercaptoetanol y 0.001% de azul de bromofenol) y se incubaron a 100°C durante 5 minutos antes de cargarlas en el gel. Se utilizó como marcador de peso molecular el Precision Plus Protein Kaleidoscope (Bio-Rad, US). La electroforesis se realizó a 80 V constantes durante 3 horas en frío en tampón de electroforesis (3 g/L de Tris-Base, 14.4 g/L de glicina y 0.96 g/L de SDS), utilizando el sistema Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, US).

Finalizada la electroforesis, se procedió a transferir las proteínas del gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (GE Healthcare Life Sciences, US), previamente activada en metanol según las instrucciones del fabricante, durante 1 hora a un amperaje constante de 0.28 A en tampón de transferencia (5.81 g/L de Tris-Base, 2.93 g/L de glicina, 0.375 g/L de SDS y 5% de metanol), utilizando el sistema Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, US). Después de la transferencia la membrana se bloqueó utilizando BSA o leche desnatada en polvo al 5% en una solución salina tamponada de Tris a pH 7,6 (TBS-T) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente, y se incubó con los anticuerpos durante toda la noche a 4°C.

La membrana se reveló utilizando el kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore, DE) en el sistema de revelado UVP EC3 Imaging System (UVP, US). Para cuantificar los niveles de proteína, las imágenes obtenidas por quimioluminiscencia se analizaron mediante densitometría utilizando el programa Master TotalLab (GE Healthcare, US).

A continuación se detallan los anticuerpos utilizados y su dilución:

Anticuerpo	Dilución
Phospho-ERK1/2 (pThr202/Tyr204) (Cell Signaling, US)	1:1000
ERK1/2 (Cell Signaling, US)	1:1000
Rrad (Santa Cruz Biotechnology, US)	1:200
Hmgcs1 (Santa Cruz Biotechnology, US)	1:200
Insig1 (Santa Cruz Biotechnology, US)	1:200
Lpin1 (Santa Cruz Biotechnology, US)	1:200
Pdk4 (Santa Cruz Biotechnology, US)	1:200
Hmgcr (Millipore, US)	1:500
Fdft1 (Abcam, UK)	1:200
Lss (Abcam, UK)	1:1000
Dhcr7 (Abnova, TW)	1:750
β -actina (Santa Cruz Biotechnology, US)	1:2000

13.- Análisis estadístico

En el caso de muestras con distribución normal se aplicó el test paramétrico t de Student. En el caso de muestras que no siguiesen una distribución normal se utilizaron los test no paramétricos U de Mann-Whitney. También se utilizó el test exacto de Fisher y ANOVA. En todos los casos, se realizaron como mínimo 3 experimentos y los datos se representaron como media \pm SEM (error estándar de la media). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas si $p < 0.05$. El análisis estadístico fue llevado a cabo usando los programas SPSS 15.0 (IBM, US) o Prism5 (GraphPad Software Inc., US).

El análisis bioinformático y estadístico del array de expresión de genoma completo de rata fue realizado por Progenika Biopharma S.A. (ES) de la siguiente forma:

En la identificación de cambios de expresión estadísticamente significativos entre los grupos de muestras se realizó un modelo de regresión lineal teniendo en cuenta el factor condición: $Y_i = \text{condición} + \epsilon$.

Donde Y_i es la intensidad Y para cada secuencia i, “condición” se refiere al efecto del aliskiren en la intensidad observada y ϵ es el error no medible que agrupa la parte no predicha del resto de variables.

De forma adicional, con el objeto de agrupar todo el conjunto de las muestras, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA, técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión de los datos) y un *cluster* jerárquico bidimensional a partir de la lista de genes significativos obtenidos. Los resultados se presentan con un p-valor asociado a cada secuencia tras el test FDR (False Discovery Rate) utilizando el programa Partek y el valor de cambio de expresión con respecto al control. Además del análisis estadístico de genes individuales en el microarray se compararon grupos funcionales de genes usando las siguientes bases de datos: IPA (IPA1 8.8; Ingenuity Systems Inc., US; www.ingenuity.com), Gene Ontology (www.geneontology.org), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) metabolic pathways (www.genome.jp/kegg/), Obesity Gene Map Database (www.obesitygene.pbrc.edu) y Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID, US)). En el sistema IPA, los cambios en la expresión génica se consideran en el contexto de interacciones físicas, transcripcionales o enzimáticas de los productos de un gen o genes, y se agrupan de acuerdo a la interacción de redes de genes. La puntuación asignada a cualquier red de genes tiene en cuenta el número total de moléculas en el conjunto de datos, el tamaño de la red y el número de genes/moléculas que forman parte de una red en el conjunto de datos. La puntuación de una red se basa en la distribución hipergeométrica y se calcula con la el test exacto de Fisher. La puntuación de la red es el logaritmo negativo de ese *p*-valor.





RESULTADOS

ALISKIREN



1.- El tratamiento con aliskiren no afecta a la viabilidad o ciclo celular de células cardíacas en cultivo

Mediante los ensayos de MTT y análisis del ciclo celular por citometría de flujo se demostró que el tratamiento con aliskiren en un rango de dosis de 1 nM a 50 μ M y durante 24 o 48 horas en cardiomiocitos de la línea celular HL-1 ($n=3$) y en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata (datos no mostrados) no presentaba efectos sobre la actividad metabólica mitocondrial y por lo tanto no alteraba la viabilidad celular. Además, el análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo mostraba que el tratamiento con aliskiren no afecta al ciclo celular ni a la mortalidad de la línea celular HL-1 (Figura 19).

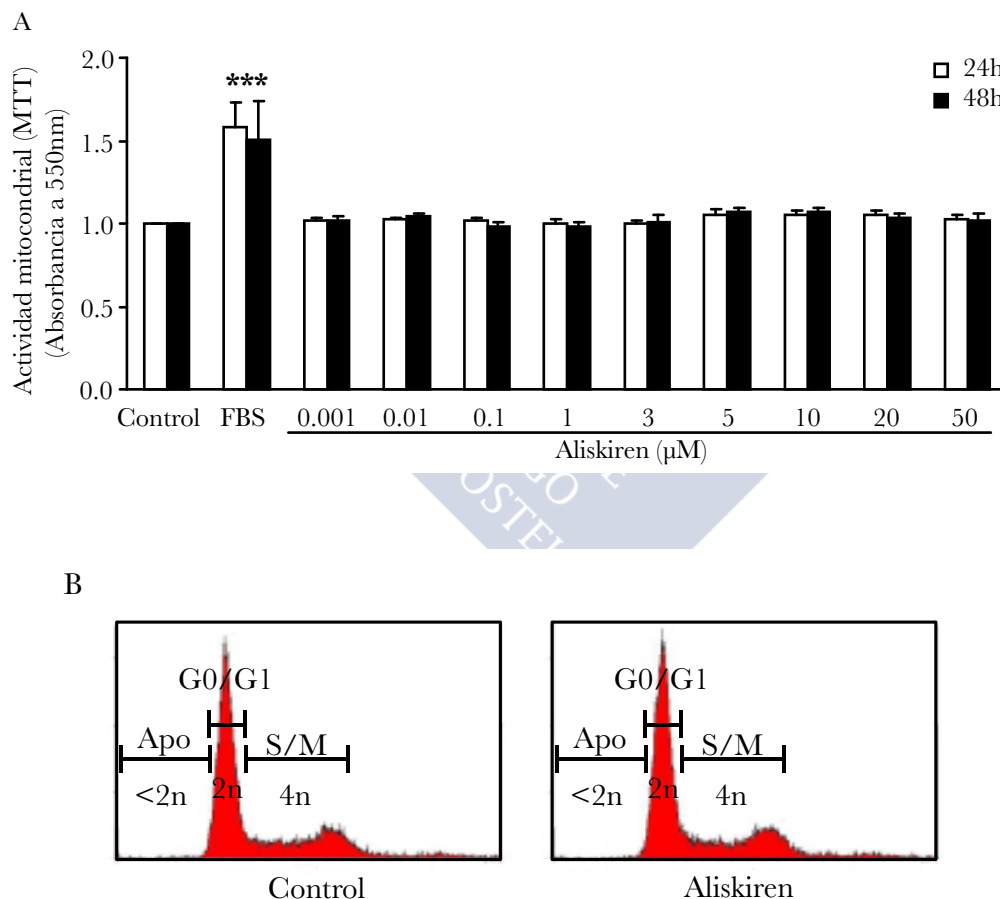


Figura 19: Efecto del tratamiento con aliskiren sobre la viabilidad cardiomiocitaria. **A:** El ensayo MTT mostró que el tratamiento con aliskiren 1 nM-50 μ M durante 24 o 48 horas no afectaba a la viabilidad de las células HL-1 ($n=3$). Se utilizó FBS como control positivo. **B:** Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo de las células HL-1 tratadas con aliskiren 50 μ M durante 24 horas y teñidas con yoduro de propidio (experimento representativo de $n=3$), mostrando el número de células frente al contenido de ADN (se muestran las células apoptóticas (Apo) o en las fases G₀/G₁ (2n) o S/M (4n)). Datos expresados como media \pm SEM en unidades arbitrarias, test estadístico t de Student. *** $p<0.001$ respecto al control.

2.- Efecto del aliskiren sobre la captación de ácidos grasos por cardiomiocitos neonatales de rata

Para estudiar el posible efecto del aliskiren sobre la captación de ácidos grasos en cardiomiocitos, se trataron con dosis de aliskiren comprendidas entre 1-50 μM cardiomiocitos de la línea celular HL-1 durante 30 minutos y cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo durante 120 minutos. Tras el tiempo de tratamiento se incubaron las células con ácido dodecanoico marcado con Bodipy® durante 30 segundos y posteriormente se analizó la fluorescencia mediante citometría de flujo.

Se demostró que el tratamiento con aliskiren inducía un incremento estadísticamente significativo en la captación de ácidos grasos después de 30 minutos en células HL-1 a dosis de 20 (1.57 ± 0.35 , $p < 0.05$, $n=4$) y de 50 (1.60 ± 0.38 , $p < 0.05$, $n=4$) μM , y después de 120 minutos en cardiomiocitos neonatales de rata a dosis de 10 (1.47 ± 0.14 , $p < 0.05$, $n=4$) y 50 (1.86 ± 0.13 , $p < 0.001$, $n=4$) μM . Se utilizó insulina a una dosis de 100 nM como control positivo (1.53 ± 0.21 , $p < 0.05$, $n=4$) (Figura 20).

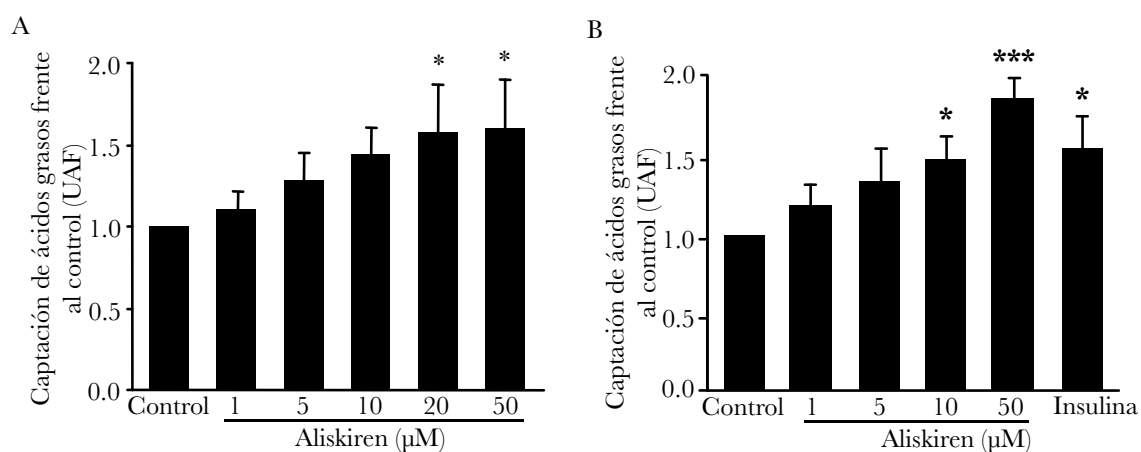


Figura 20: Análisis estadístico de la captación de ácido dodecanoico marcado con Bodipy® mediante citometría de flujo. **A:** cardiomiocitos de la línea HL-1 a los 30 minutos de tratamiento con aliskiren. **B:** cardiomiocitos neonatales de rata a después de 120 minutos de tratamiento. UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia. Datos expresados como media \pm SEM, test estadístico t de Student. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ respecto al control.

3.- Efecto del tratamiento con aliskiren sobre la movilización de CD-36 y GLUT-4

CD-36 es una glicoproteína de membrana que actúa como un receptor inmuno-metabólico multifuncional para diversos ligandos.²⁹⁸ Una de sus funciones fisiológicas en el corazón es la de contribuir al aumento de la captación de ácidos grasos de cadena larga, y también actúa regulando la actividad de AMPK para ajustar la utilización y oxidación de los ácidos grasos.²⁹⁸ Además, se ha podido observar que los cambios en los niveles o función de CD-36 tienen implicaciones en alteraciones del metabolismo cardiaco y en la fisiopatología de ciertas patologías cardiovasculares.²⁹⁹ Por su parte, GLUT-4 es el transportador de glucosa más abundante en el corazón, cuya translocación a la membrana se encuentra principalmente regulada por la insulina y la contracción muscular, y que es responsable de la entrada de la mayoría de la glucosa en los cardiomiocitos.^{300,301} La reducción en la expresión cardiaca de GLUT-4 se ha asociado a la pérdida de la flexibilidad metabólica y al aumento de la resistencia a la insulina.³⁰²

Mediante las técnicas de inmunocitoquímica y microscopía confocal se estudió la movilización del transportador de ácidos grasos CD-36 y el transportador de glucosa GLUT-4 en cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo y cardiomiocitos adultos humanos. Se demostró que el tratamiento durante 30 minutos con aliskiren incrementaba la localización en la membrana plasmática de CD-36 en cardiomiocitos neonatales de rata y cardiomiocitos adultos humanos a dosis de 10 y 50 μM (Figura 21; Tabla 1). El tratamiento con aliskiren durante 30 minutos también causaba un descenso complementario en la localización del transportador GLUT-4 en el compartimento citoplasma/membrana plasmática de cardiomiocitos neonatales de rata a dosis de 10 (0.877 ± 0.009 ; $p < 0.01$, $n=138$), 20 (0.857 ± 0.010 ; $p < 0.01$, $n=139$) y 50 (0.804 ± 0.014 , $p < 0.001$, $n=96$) μM (Figura 21; Tabla 1). Estos cambios fueron dosis dependientes (Tabla 1) y no significativos a los 15 minutos de tratamiento (datos no mostrados). Cabe señalar que los cambios que se observaron en la captación de ácidos grasos y la redistribución intracelular de los transportadores CD-36 y GLUT-4 después del tratamiento con aliskiren se obtuvieron con dosis de 10 μM , y que estudios previos han mostrado que las concentraciones de aliskiren en este rango están presentes en la sangre durante el tratamiento con aliskiren.²⁹¹

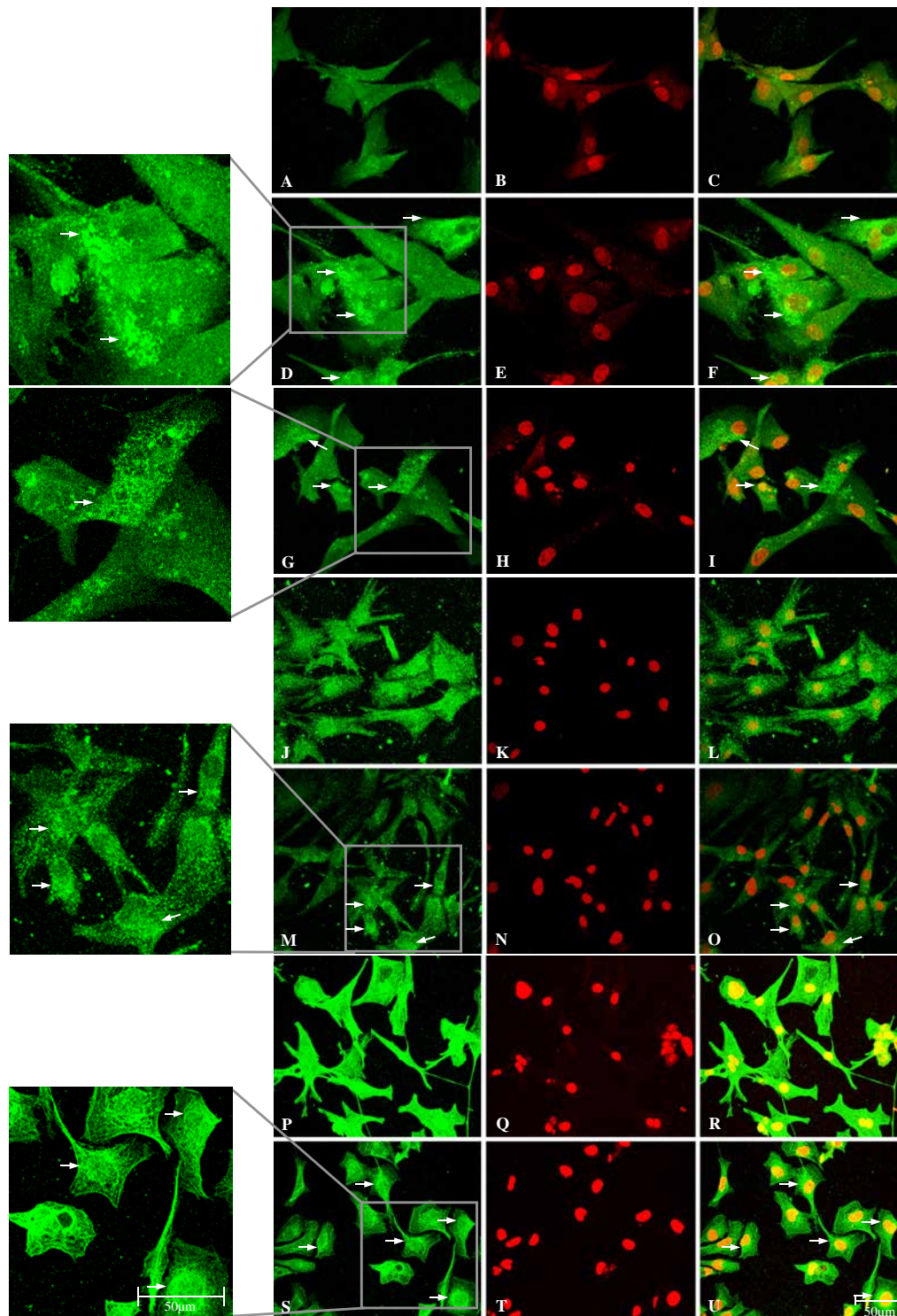


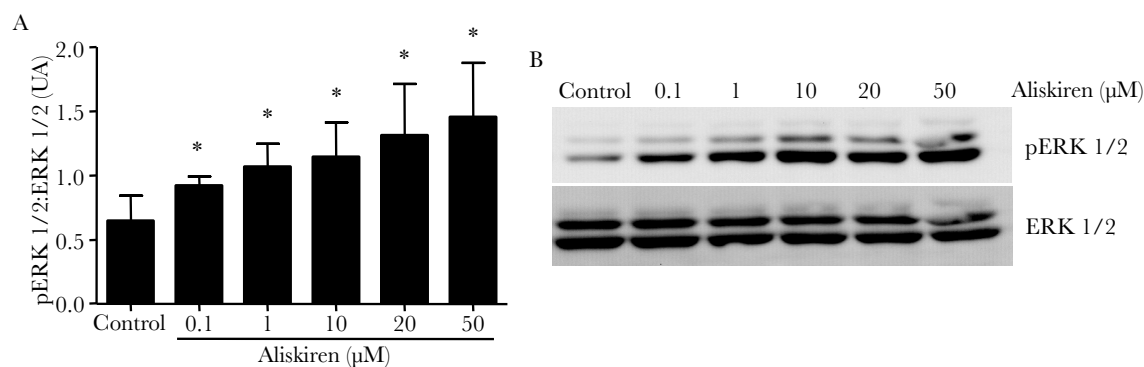
Figura 21: La inmunocitoquímica y el análisis por microscopía confocal mostraron que el aliskiren incrementaba la localización de CD-36 en la membrana plasmática en cardiomiocitos adultos humanos (A-C: controles; D-F: aliskiren 50 μ M; G-I: aliskiren 10 μ M; los ejemplos están indicados con flechas) y en cardiomiocitos neonatales de rata (J-L: controles; M-O: aliskiren 50 μ M; los ejemplos están indicados con flechas) después de 30 minutos de tratamiento. La dosis de aliskiren 10 μ M causó un descenso complementario en la cantidad de GLUT-4 en el compartimento citoplasma/membrana plasmática en cardiomiocitos neonatales de rata después de 30 minutos de tratamiento (P-R: controles; S-U: aliskiren 10 μ M; los ejemplos están indicados con flechas). Columna izquierda: (A, D, G, J, M, P, S): expresión del anticuerpo; columna central (B, E, H, K, N, Q, T): marcador de núcleos TO-PRO-3; columna derecha (C, F, I, L, O, R, U): colocalización. Izquierda del panel central: D, G, M y S se muestran ampliados. Escala: 50 μ m.

	Dosis de aliskiren (30 minutos tratamiento)				
	0 μ M	5 μ M	10 μ M	20 μ M	50 μ M
Expresión en la membrana plasmática (% y número de células totales)					
CD-36 (humano)	14.8 (210)	-	44.0 (175)	-	71.7 (145)
CD-36 (rata)	17.0 (171)	-	59.2 (142)	-	82.0 (152)
GLUT-4 (rata)	27.5 (138)	12.1 (132)	10.1 (138)	8.6 (139)	7.3 (96)
Ratio citop./memb. plasmática:núcleo de la distribución de GLUT-4 (rata) (media \pm SEM)	0.993 \pm 0.043	0.873 \pm 0.056	0.877 \pm 0.009	0.857 \pm 0.010	0.804 \pm 0.014
p-valor frente al control	ns	ns	$p<0.01$	$p<0.01$	$p<0.001$
Número total de células	138	132	138	139	96

Tabla 1: Expresión en la membrana plasmática del transportador de ácidos grasos CD-36 y el transportador de glucosa GLUT-4 como función del número total de células, especie de origen de los cardiomiocitos y dosis de aliskiren. Datos expresados como media \pm SEM, test estadístico de Mann Whitney.

4.- Efecto del aliskiren sobre la activación de ERK1/2 y sobre la expresión de los receptores (P)RR e Igf2r/M6F

Mediante la técnica de Western blot se observó que el aliskiren inducía la fosforilación intracelular del ERK1/2 tanto en la línea cardiomiocitaria HL-1 como en cardiomiocitos neonatales de rata y adultos humanos. En los experimentos llevados a cabo con cultivos primarios neonatales de rata se observó que la fosforilación de ERK1/2 era dependiente en dosis, con un efecto máximo con aliskiren 50 μ M (1.45 ± 0.51 , $p<0.05$, $n=4$), y en tiempo, con una respuesta máxima a los 5 minutos (1.42 ± 0.33 , $p<0.001$, $n=8$) (Figura 22).



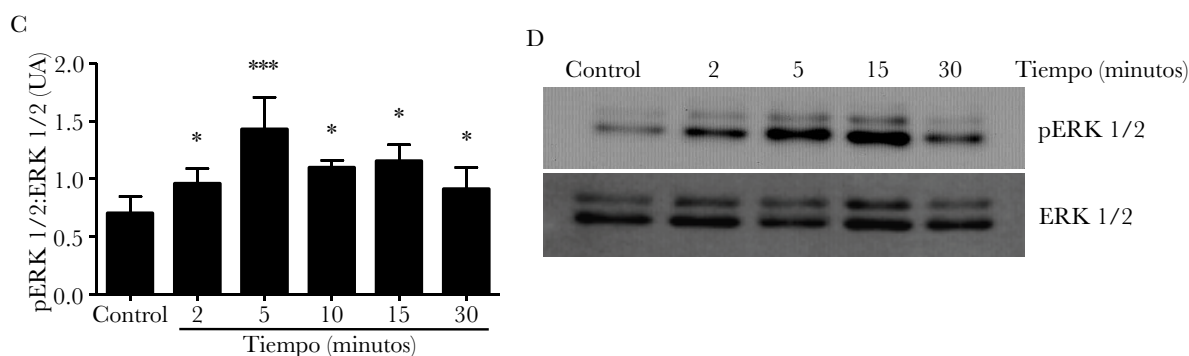


Figura 22: Efecto del aliskiren sobre la fosforilación intracelular de ERK1/2 en cardiomiocitos neonatales de rata. **A:** Análisis estadístico de la activación dosis dependiente de ERK1/2 tras el tratamiento con aliskiren durante 5 minutos. **B:** Western blot representativo del efecto de aliskiren sobre la fosforilación de ERK1/2 tras 5 minutos de tratamiento. **C:** Análisis estadístico de la activación de ERK1/2 tras el tratamiento con aliskiren a una dosis de 50 μ M a diferentes tiempos. **D:** Western blot representativo del efecto de aliskiren sobre la fosforilación de ERK1/2 tras el tratamiento con una dosis de 50 μ M a diferentes tiempos. UA: unidades arbitrarias de densitometría. Datos expresados como media \pm SEM, test estadístico de Mann Whitney. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ respecto al control.

En cardiomiocitos adultos humanos también se observó un incremento significativo en la fosforilación de ERK1/2 con respecto al control (0.50 ± 0.07 , $n=5$) después de haber sido tratados con aliskiren 50 μ M durante 5 minutos (1.05 ± 0.08 , $p < 0.01$, $n=5$) (dosis y tiempo óptimos que habían sido previamente determinados en cardiomiocitos neonatales de rata). Además, la fosforilación de ERK1/2 no se encontraba afectada por el tratamiento con renina recombinante humana o de rata a dosis de 0.01 μ M, tanto en cardiomiocitos neonatales de rata (1.63 ± 0.23 , $p < 0.01$, $n=4$), como en cardiomiocitos adultos humanos (1.33 ± 0.05 , $p < 0.01$, $n=5$). (Figura 23). Las células HL-1 también mostraron una fosforilación de ERK1/2 dependiente de tiempo y dosis similar en respuesta al tratamiento con aliskiren (Figura 23).

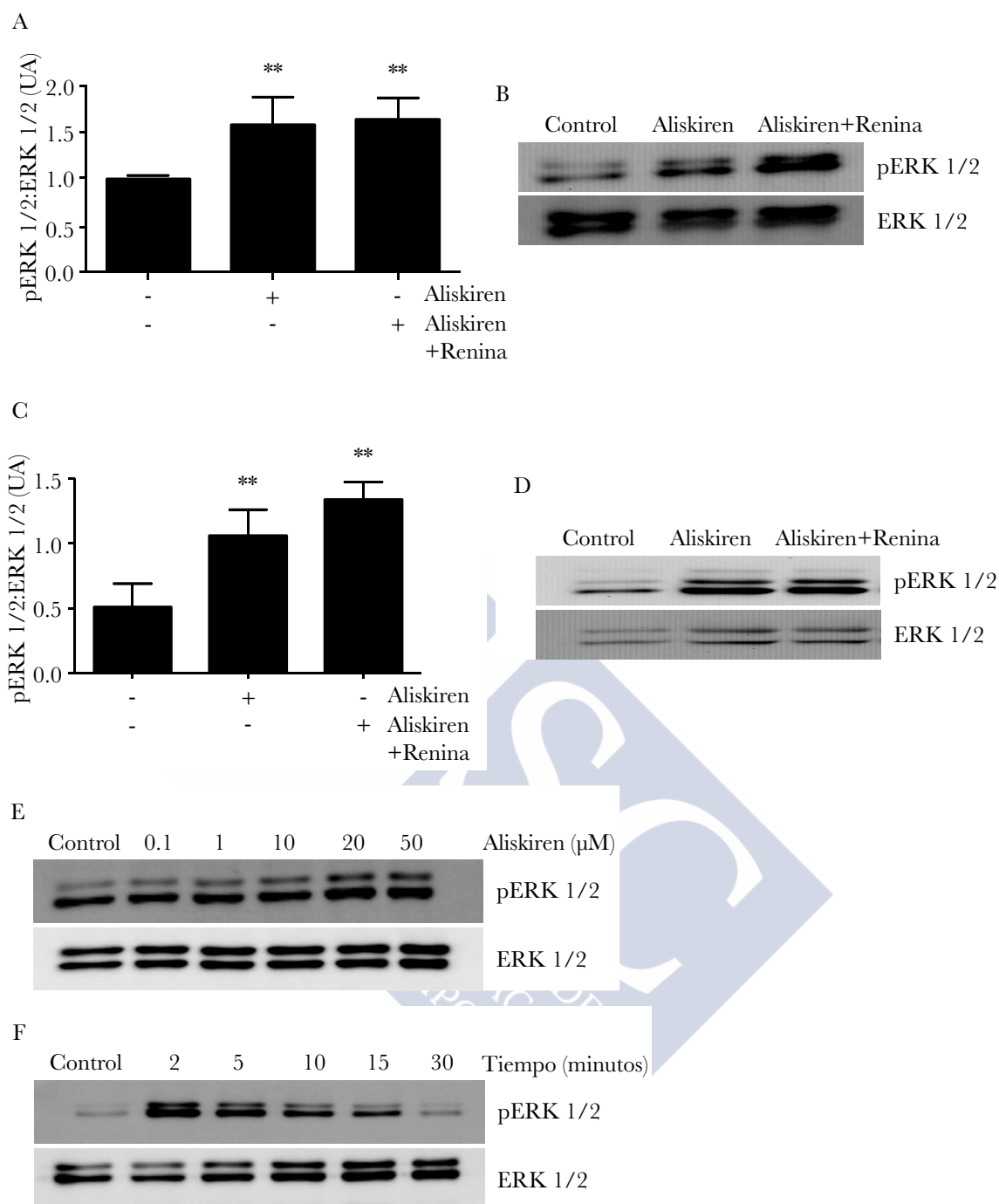


Figura 23: El aliskiren inducía la fosforilación intracelular de ERK1/2 en cardiomiocitos adultos humanos y cardiomiocitos neonatales de rata. **A:** Análisis estadístico de la activación de ERK1/2 tras el tratamiento con aliskiren 50 μ M durante 5 minutos en cardiomiocitos adultos humanos mostrando que la fosforilación no se encontraba afectada por el tratamiento con renina 0.01 μ M. **B:** Western blot representativo del efecto de aliskiren 50 μ M y renina 0.01 μ M sobre la fosforilación de ERK1/2 en cardiomiocitos adultos humanos. **C:** Análisis estadístico de la activación de ERK1/2 tras el tratamiento con aliskiren 50 μ M durante 5 minutos en cardiomiocitos neonatales de rata mostrando que dicha fosforilación no estaba afectada por el tratamiento con renina 0.01 μ M. **D:** Western blot representativo del efecto de aliskiren 50 μ M y renina 0.01 μ M sobre la fosforilación de ERK1/2 cardiomiocitos neonatales de rata. El tratamiento con aliskiren también provocó la fosforilación de ERK1/2 en células HL-1 de forma dosis (**E**) y tiempo (**F**) dependientes. UA: unidades arbitrarias de densitometría. Datos expresados como media \pm SEM, test estadístico de Mann Whitney.** $p < 0.01$ respecto al control.

Mediante RT-qPCR se analizaron los niveles de expresión de ARNm para los receptores (P)R e Igf2r/M6F. Se comprobó que tanto en células HL-1 como en cardiomiocitos neonatales de rata el tratamiento con aliskiren 50 μ M durante 3 horas no inducía cambios en los niveles de ARNm en los receptores (P)R e Igf2r/M6F (n=4) (Figura 24).

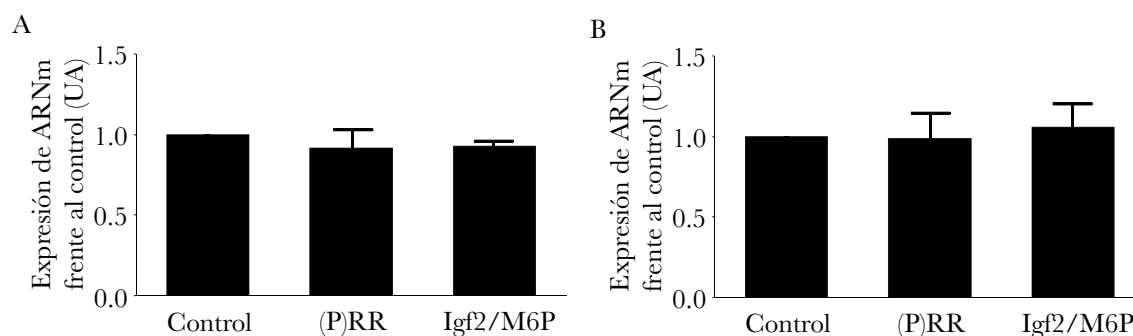


Figura 24: Efecto del aliskiren sobre la expresión de los receptores (P)R e Igf2r/M6F. El tratamiento con aliskiren 50 μ M durante 3 horas no provocó cambios significativos en la expresión de ARNm de (P)RR como e Igf2r/M6P tanto en células HL-1 (**A**) como en cardiomiocitos neonatales de rata (**B**). UA: unidades arbitrarias. Datos expresados como media \pm SEM, test estadístico de Mann Whitney.

5.- Array de expresión de genoma completo de rata

El análisis bioinformático de los resultados del microarray de genoma completo mostró que las secuencias de 652 genes se encontraban modificados de forma significativa tras el tratamiento con aliskiren 50 μ M durante 3 horas en cardiomiocitos neonatales de rata. Se analizaron las interacciones a nivel funcional entre los genes cuya expresión se encontraba alterada mediante el uso del sistema IPA (Ingenuity Pathway Analysis), como se ha descrito previamente,^{303,304} que se encuentra integrado con otras bases de datos como la KEGG Metabolic Pathways o la Gene Ontology and Obesity Gene Map Database. En la Figura 25 se resumen los resultados globales obtenidos en el microarray utilizando las bases de datos Gene Ontology e IPA.

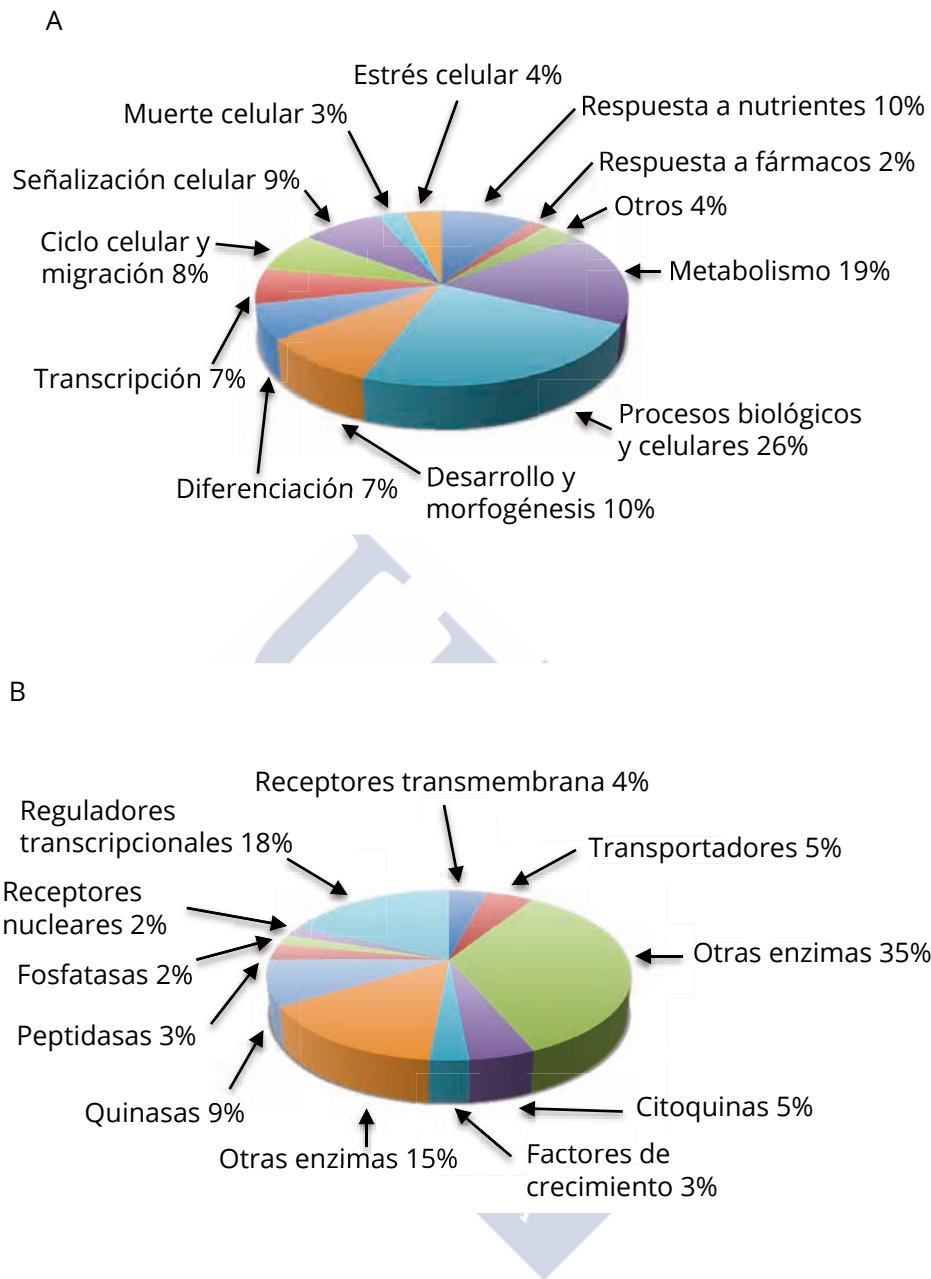


Figura 25: Resumen global de resultados obtenidos del análisis del microarray con las bases de datos Gene Ontology e IPA. **A:** Distribución de genes alterados en cardiomiocitos por el tratamiento con aliskiren de acuerdo con su función biológica. **B:** Distribución de los genes de acuerdo a su tipo molecular.

El análisis funcional de todo el conjunto de datos usando IPA identificó las funciones biológicas y alteraciones cardíacas con mayor nivel de significatividad estadística mediante el establecimiento de criterios de selección enfocados a funciones biológicas y celulares relacionadas con las células del sistema cardiovascular (con un punto de corte de $p < 0.001$), y con la función cardiovascular (con un punto de corte de $p < 0.05$) (Tabla

2). Se usó el test exacto de Fisher para calcular los p valores que indican la probabilidad de que cada función biológica y/o patología asociada al conjunto de datos no sea debida solo a la casualidad. La clasificación funcional de los genes expresados de forma diferencial reveló un grupo de genes implicados en el metabolismo de lípidos como la función biológica alterada con el p valor más bajo ($p < 10^{-4}$) (Tabla 2).

Función biológica	p -valor
Metabolismo lipídico	2.44×10^{-5}
Bioquímica de moléculas pequeñas	2.44×10^{-5}
Metabolismo de vitaminas y minerales	2.44×10^{-5}
Desarrollo celular	4.35×10^{-5}
Crecimiento celular y proliferación	1.31×10^{-4}
Ciclo celular	1.72×10^{-4}
Función y desarrollo del tejido conectivo	1.72×10^{-4}
Desarrollo y función del sistema	2.34×10^{-4}
Desarrollo del organismo	2.34×10^{-4}
Muerte celular	3.22×10^{-4}
Morfología de órganos	4.19×10^{-4}
Desarrollo embrionario	5.44×10^{-4}
Enfermedades hematológicas	6.13×10^{-4}
Enfermedades metabólicas	6.13×10^{-4}
Morfología celular	7.40×10^{-4}
Alteraciones cardíacas	p -valor
Proliferación cardíaca	9.41×10^{-3}
Insuficiencia cardíaca	3.05×10^{-2}
Daño cardíaco	3.54×10^{-2}
Cardiomegalia	3.54×10^{-2}
Hipertensión pulmonar	3.54×10^{-2}
Necrosis cardíaca/muerte celular	3.83×10^{-2}

Tabla 2: Análisis funcional del microarray mediante el uso de IPA para identificar las funciones biológicas y alteraciones cardíacas con mayor significatividad en el conjunto de datos. Los genes que comprenden funciones biológicas poseen un p valor < 0.001 mientras que los genes de alteraciones cardíacas poseen un p valor < 0.05 .

A continuación se estudiaron las interacciones funcionales entre los genes alterados. Mediante el uso del programa IPA se identificó una red de interacción que contenía genes relacionados con el metabolismo lipídico y/o de ácidos grasos cuya expresión se encontraba alterada por el tratamiento con aliskiren en cardiomiocitos (Figura 26).

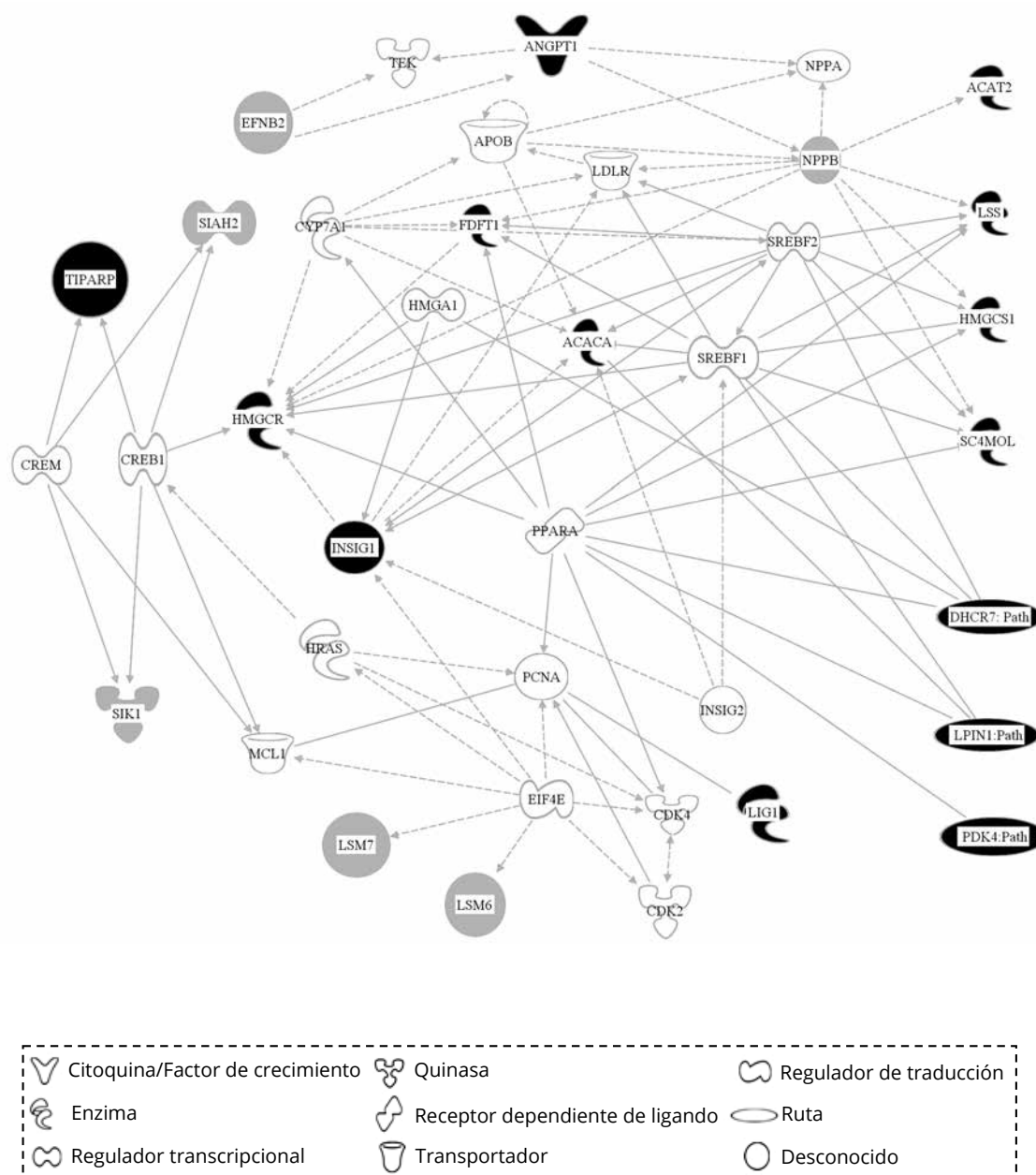


Figura 26: Red interactiva con los genes alterados con mayor significatividad en cardiomiocitos tratados con aliskiren (en relación con las células no tratadas). Los genes y sus productos están representados por sus abreviaturas comunes y las líneas representan interacciones directas (línea continua) o indirectas (línea de puntos), así como la naturaleza de la interacción (por ejemplo, de unión (línea recta), activación (flecha) o inhibición (línea truncada)). Los genes cuya expresión se encontraba aumentada significativamente en el grupo tratado con aliskiren (con relación al control) están destacados en color negro, el blanco indica que no hubo cambios en la expresión y la reducción en su expresión se muestra en color gris. La forma de cada gen denota la función de su producto.

6.- Efecto del aliskiren sobre la expresión de enzimas clave en el metabolismo lipídico y biosíntesis del colesterol en cardiomiocitos

Para confirmar los resultados obtenidos en el microarray se eligieron tres genes implicados en el metabolismo lipídico y/o de ácidos grasos, cuya expresión se encontraba aumentada por el tratamiento con aliskiren y presentaban los p valores más bajos ($p < 0.001$): *Insig1* (insulin induced gene 1) (incrementado 1.60 veces respecto al control), *Lpin1* (lipina 1) (incrementado 1.46 veces respecto al control) y *Pdk4* (pyruvate dehydrogenase kinase 4) (incrementado 1.80 veces respecto al control). Además, se encontraban incluidos en la red con mayor significatividad estadística en el análisis IPA. También se añadieron dos genes adicionales para confirmar los análisis: *Rrad* (ras-related associated with diabetes), cuya expresión se encontraba disminuida por el aliskiren ($p < 0.001$) mostrando el mayor cambio después de 3 horas de tratamiento con aliskiren (disminuido 2.46 veces respecto al control) y que es un gen que se encuentra relacionado con la contractilidad, la viabilidad y el metabolismo de la glucosa en cardiomiocitos,³⁰⁵⁻³⁰⁷ y *Arid5a* (AT-rich interaction domain 5a), implicado en la regulación del crecimiento, la respuesta a estrógenos, la inflamación y el metabolismo de los triglicéridos,^{308,309} cuya expresión también se encontraba disminuida por el tratamiento con aliskiren (disminuido 2.16 veces frente al control) con el p valor más bajo de todos los genes alterados en el microarray ($p = 7.38 \times 10^{-5}$).

Mediante RT-qPCR y Western blot se confirmaron los resultados obtenidos en el microarray. Se analizaron los niveles de expresión de ARNm en cardiomiocitos neonatales de rata tratados con aliskiren 50 μ M durante 3 donde se observó que la expresión de *Insig1* (2.04 ± 0.47 , $p < 0.01$, $n = 5$), *Lpin1* (2.12 ± 0.80 , $p < 0.05$, $n = 5$) y *Pdk4* (1.63 ± 0.48 , $p < 0.05$, $n = 5$) (enzimas involucradas en el metabolismo lipídico) se encontraba incrementada con respecto al control y que, por el contrario, la expresión del ARNm de *Rrad* (0.29 ± 0.15 , $p < 0.001$, $n = 5$) (involucrada en el metabolismo de la glucosa) se encontraba disminuida, así como los niveles de ARNm de *Arid5a* (0.74 ± 0.10 , $p < 0.05$, $n = 5$) (implicada en inflamación y metabolismo de triglicéridos) respecto al control (Figura 27).

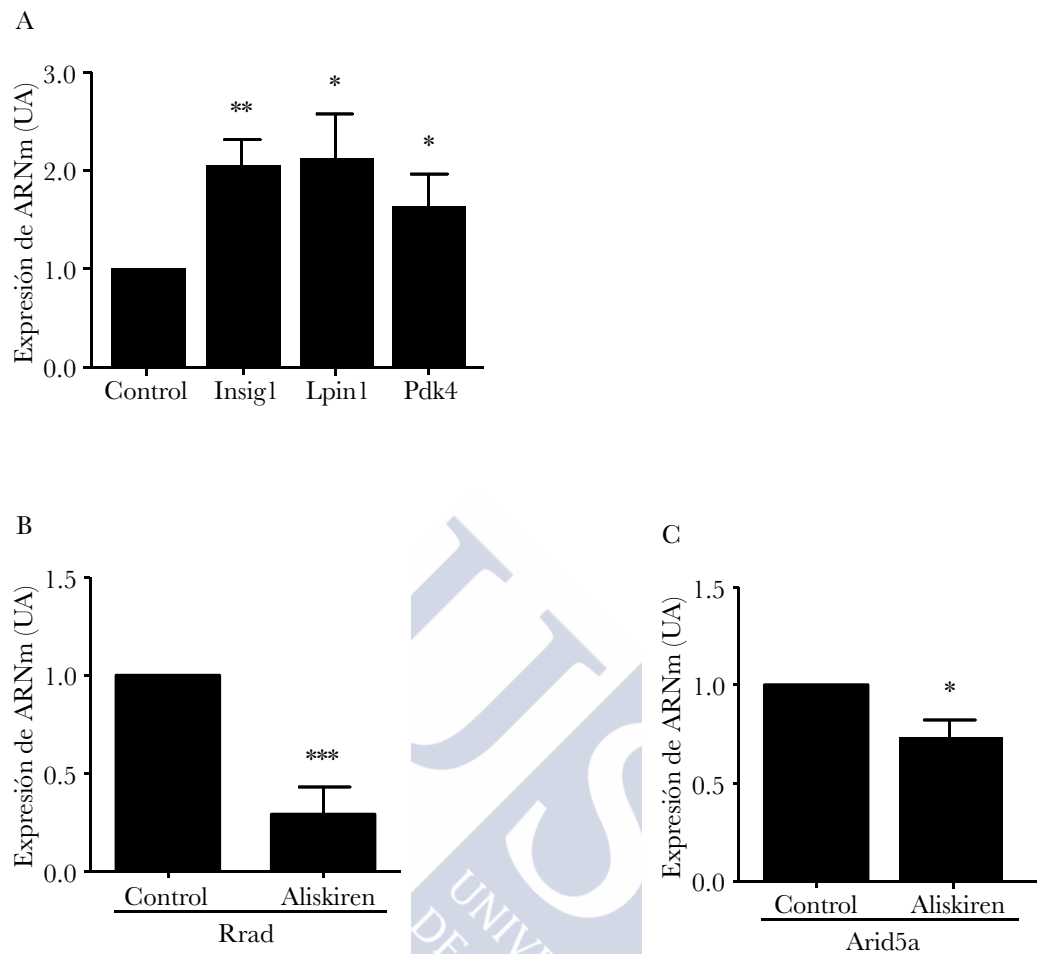


Figura 27: Mediante RT-qPCR se confirmaron los resultados obtenidos en el análisis del microarray en cardiomiocitos neonatales de rata tratados con aliskiren 50μM durante 3 horas. Los niveles de expresión de ARNm de Insig1, Lpin1 y Pdk4 estaban incrementados significativamente con respecto al control (**A**) mientras que los niveles de Rrad (**B**) y Arid5a (**C**) se encontraban disminuidos por el tratamiento con aliskiren. UA: unidades arbitrarias. Datos expresados como media±SEM, test estadístico de Mann Whitney.* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ respecto al control.

El Western blot confirmó estos cambios a nivel de proteína en cardiomiocitos neonatales de rata tratados con aliskiren 50 μM durante 6 horas. Los niveles proteicos de Insig1 (1.83 ± 0.11 , $p<0.01$, $n=4$), Lpin1 (1.46 ± 0.41 , $p<0.05$, $n=3$) y Pdk4 (1.79 ± 0.60 , $p<0.05$, $n=5$) se encontraban incrementados con respecto al control, mientras que los niveles de proteína de Rrad (0.50 ± 0.18 , $p<0.05$, $n=4$) se encontraban disminuidos (Figura 28). También se observó el incremento en los niveles proteicos de Lpin1, mediado por el tratamiento con aliskiren, en cardiomiocitos adultos humanos (Figura 28). La expresión de los niveles de proteína de Arid5a no fueron evaluados por no encontrarse disponible en el momento un anticuerpo comercial con buena calidad.

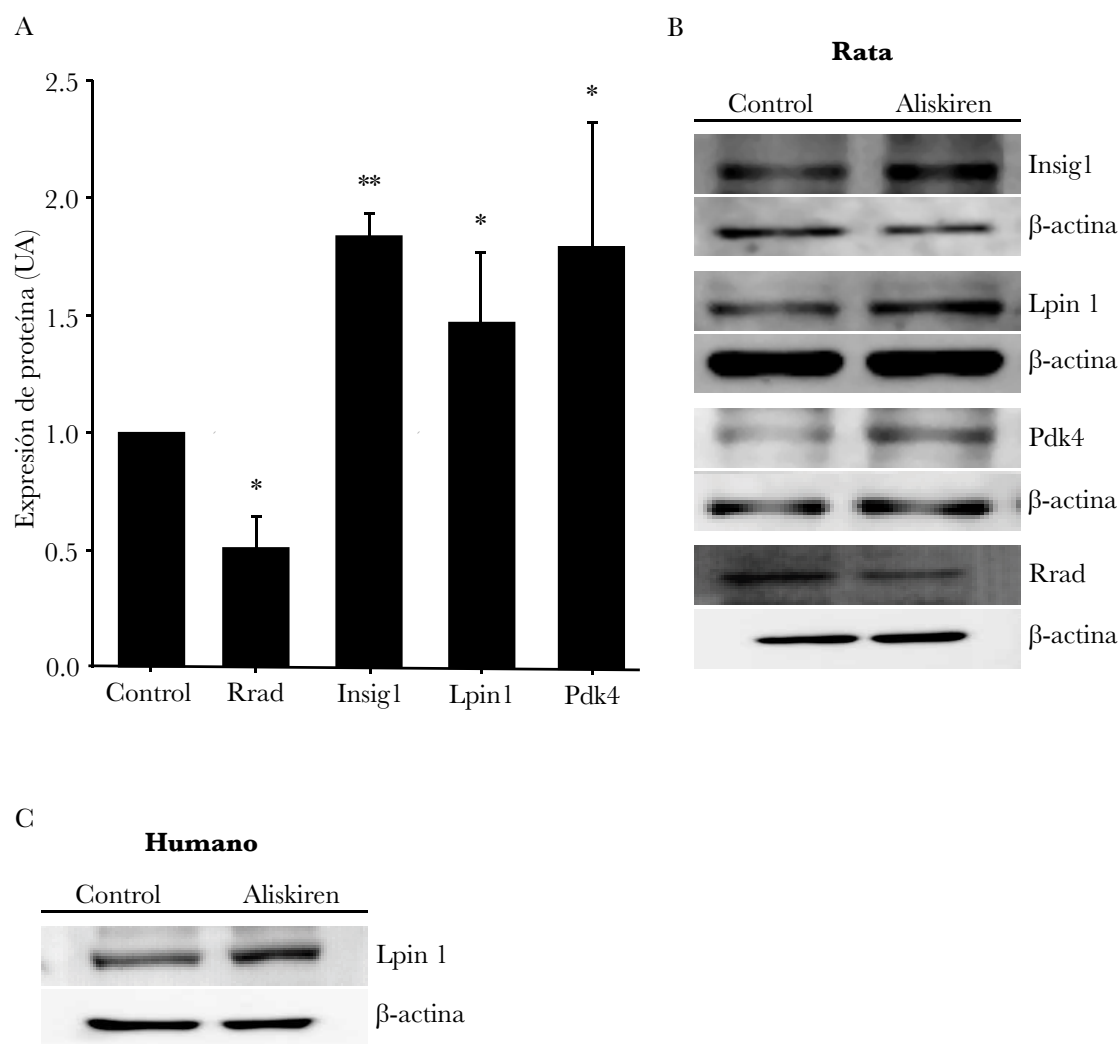


Figura 28: Mediante Western blot se confirmaron los resultados del array a nivel de proteína. **A:** Análisis estadístico de los niveles de proteicos de Rrad, Insig1, Lpin1 y Pdk4 tras el tratamiento con aliskiren 50 μ M durante 6 horas con respecto a los controles. **B:** Western blot representativo del efecto de aliskiren sobre los niveles de Rrad, Insig1, Lpin1 en cardiomiocitos neonatales de rata tras el tratamiento con aliskiren. **C:** Western blot representativo del efecto de aliskiren 50 μ M durante 6 horas sobre los niveles de proteína de Lpin1 en cardiomiocitos adultos humanos. UA: unidades arbitrarias. Datos expresados como media \pm SEM, test estadístico de Mann Whitney y t de Student.* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecto al control.

El análisis del microarray por grupos funcionales de genes reveló que la ruta de biosíntesis del colesterol se encontraba notablemente alterada tras el tratamiento de 3 horas con aliskiren 50 μ M en cardiomiocitos neonatales de rata. De hecho, la ruta de biosíntesis de esteroides fue seleccionada en la base de datos KEGG Metabolic Pathways con un p valor de 10^{-6} y por IPA con un p valor de 10^{-4} . Por tanto, se seleccionaron del análisis estadístico del microarray los siguientes genes pertenecientes a la ruta metabólica del colesterol para confirmar los cambios observados en su expresión mediante RT-qPCR y Western blot: Hmgcs1 (hidroximetilglutaril-CoA sintasa 1

citósica) (incrementado 1.43 veces respecto al control, $p<0.001$), Hmgcr (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa) (incrementado 1.31 veces respecto al control, $p<0.01$), Fdft1 (farnesil-difosfato farnesil transferasa 1) (incrementado 1.22 veces respecto al control, $p<0.05$), Lss (lanosterol sintasa) (incrementado 1.19 veces respecto al control, $p<0.05$) y Dhcr7 (7-dehidrocolesterol reductasa) (incrementado 1.56 respecto al control, $p<0.01$). Todos estos genes implicados en la ruta de síntesis del colesterol se encontraban representados asimismo en la red de metabolismo de lípidos generada por IPA, habiendo obtenido los valores más altos de significatividad en el análisis de todo el array (Figura 26). Mediante RT-qPCR se analizaron los niveles de expresión de ARNm para las enzimas implicadas en la biosíntesis del colesterol en cardiomiocitos neonatales de rata tratados con aliskiren 50 μM durante 3 horas. Se comprobó que la expresión de Hmgcs1 (1.99 ± 0.38 , $p<0.05$, $n=5$), Hmgcr (1.67 ± 0.34 , $p<0.05$, $n=5$), Fdft1 (1.95 ± 0.35 , $p<0.01$, $n=5$), Lss (1.30 ± 0.21 , $p<0.05$, $n=5$) y Dhcr7 (2.27 ± 0.47 , $p<0.01$, $n=5$) se encontraba incrementada de forma significativa con respecto al control (Figura 29).

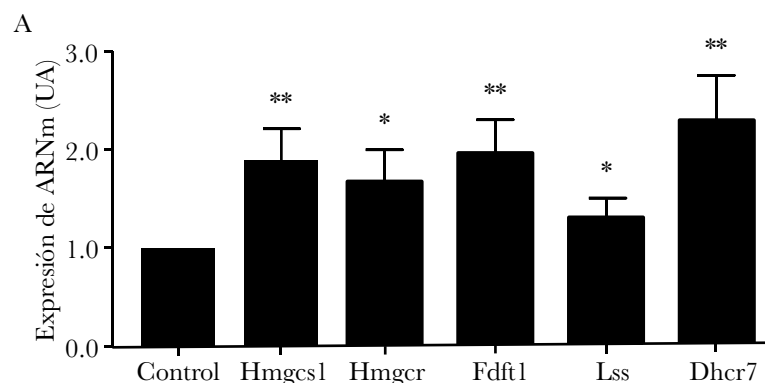


Figura 29: La RT-qPCR confirmó los cambios en la expresión de genes implicados en la síntesis de colesterol en cardiomiocitos neonatales de rata tratados con aliskiren 50 μM durante 3 horas. Los niveles de expresión de ARNm de Hmgcs1, Hmgcr, Fdft1, Lss y Dhcr7 se encontraban incrementados significativamente con respecto al control (A). UA: unidades arbitrarias. Datos expresados como media \pm SEM, test estadístico de Mann Whitney. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ respecto al control.

El Western blot confirmó estos cambios a nivel de proteína en cardiomiocitos neonatales de rata tratados con aliskiren 50 μM durante 6 horas: Hmgcs1 (1.85 ± 0.31 , $p<0.05$, $n=3$), Hmgcr (1.44 ± 0.19 , $p<0.05$, $n=4$), Fdft1 (1.44 ± 0.11 , $p<0.05$, $n=3$), Lss (2.31 ± 0.14 , $p<0.01$, $n=3$) y Dhcr7 (1.61 ± 0.23 , $p<0.05$, $n=3$) y en cardiomiocitos adultos humanos (Figura 30).

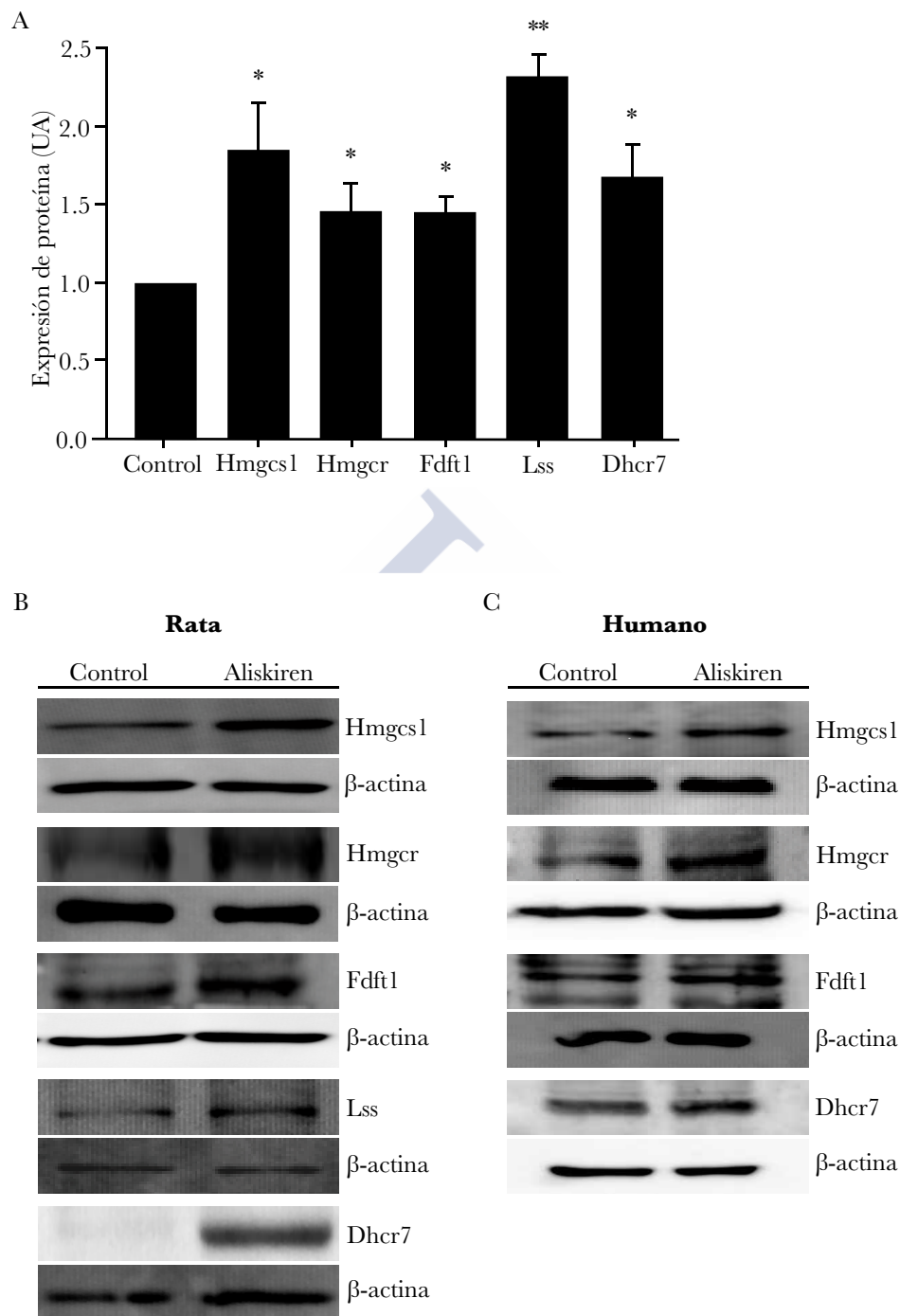


Figura 30: Los resultados del array también fueron comprobados a nivel de proteína mediante Western blot. **A:** Análisis estadístico de los niveles de proteicos de Hmgcs1, Hmgcr, Fdft1, Lss y Dhcr7 después del tratamiento con aliskiren 50µM durante 6 horas, con respecto a los controles. **B:** Western blot representativo del efecto de aliskiren sobre los niveles de Hmgcs1, Hmgcr, Fdft1, Lss y Dhcr7 en cardiomiocitos neonatales de rata tras el tratamiento con aliskiren. **C:** Western blot representativo del efecto de aliskiren 50 µM durante 6 horas en los niveles de proteína de Hmgcs1, Hmgcr, Fdft1 y Dhcr7 en cardiomiocitos adultos humanos. UA: unidades arbitrarias. Datos expresados como media±SEM, test estadístico de Mann Whitney y t de Student. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecto al control.



DISCUSIÓN

ALISKIREN



La hipertensión arterial es el factor de riesgo modificable más importante dada su amplia prevalencia en la población y la magnitud de riesgo cardiovascular asociado por su contribución al desarrollo de la aterosclerosis coronaria, la insuficiencia cardíaca, la fibrilación atrial y otras repercusiones a nivel sistémico que afectan a diferentes órganos diana.¹¹⁸ El SRAA desempeña un papel clave en la regulación de la presión y homeostasis sanguínea, y se ha comprobado que la alteración en la actividad del SRAA no solo está implicada en el desarrollo de la hipertensión arterial y las patologías asociadas a esta, sino que también participa en procesos inflamatorios, trombóticos, fibróticos y de estrés oxidativo.¹¹⁸ El SRAA se bloquea desde hace años de forma bastante satisfactoria a través de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) y antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARAI),^{121,310} sin embargo, existen una serie de mecanismos compensatorios que incrementan la cantidad de renina en plasma y que finalmente actúan a modo de sistema de compensación de los niveles de producción y conversión de AngII, haciendo que la inhibición no sea completamente satisfactoria.^{121,310}

El inhibidor directo de la renina aliskiren ha demostrado ser un fármaco antihipertensivo eficaz en la reducción de la hipertensión arterial con efectos similares a los IECAs y ARAII.¹⁵⁰ Además, también se ha observado que el aliskiren puede tener efectos beneficiosos adicionales, y diferentes estudios desarrollados en modelos *in vivo* murinos han puesto de manifiesto la capacidad del aliskiren para disminuir la concentración de factores proinflamatorios, aterogénicos y profibróticos, así como su habilidad en la mejora de la respuesta a la isquemia/reperfusión y estrés oxidativo mediante la activación de la vía PI3K/AKT/eNOS.^{264–266,270,275}

El número de estudios que han examinado el papel del aliskiren a nivel cardíaco es limitado^{272,273,292,311–314} y, debido a que es un fármaco que se ha propuesto para el tratamiento de la hipertensión arterial en un amplio rango de pacientes, consideramos necesario estudiar los efectos a nivel cardíaco de un fármaco que inhibe el SRAA, sobretudo teniendo en cuenta que (tal y como hemos descrito anteriormente (ver Introducción Aliskiren, página 34)) a nivel cardíaco es donde más sólidamente está fundamentada la existencia de un sistema renina-angiotensina local. Por ello, en este trabajo de tesis doctoral nuestro objetivo ha sido el de evaluar la influencia del aliskiren sobre la viabilidad y el metabolismo de cardiomiocitos, mediante el uso de

concentraciones de aliskiren similares a las descritas y utilizadas en estudios previos en células y plasma humano.^{288–293} El principal resultado de este estudio ha sido el hallazgo de que el aliskiren es capaz de incrementar significativamente la captación de ácidos grasos de cadena media (ácido docecanoico), modificar la distribución intracelular del transportador de ácidos graso CD-36 y de glucosa GLUT-4 y alterar la expresión de enzimas clave en el metabolismo de lípidos y glucosa en cardiomiocitos murinos y humanos en cultivo, y de forma dosis-dependiente. Además, hemos hallado que el aliskiren tiene la capacidad de aumentar la expresión de diversas enzimas a lo largo de la ruta de biosíntesis del colesterol, y todos estos genes se encontraban en una red de genes implicados en el metabolismo lipídico generada a partir de nuestros resultados.

Existen diversos trabajos en los que se ha examinado el efecto de los componentes del SRAA y su inhibición en células cardíacas. Se sabe que la AngII a través del receptor AT1-R desempeña un papel importante en el desarrollo de la hipertrofia, el remodelado cardíaco, la autofagia, el aumento del estrés oxidativo e inflamación, y reduce la señalización de la insulina, en parte, mediante el descenso en la fosforilación de AKT, como se ha podido comprobar en cardiomiocitos en modelos murinos y en humanos.^{315–320} Otro de los efectores del SRAA, la aldosterona, ha demostrado incrementar la hipertrofia y el estrés oxidativo en cardiomiocitos de rata.^{321,322} Además, se ha comprobado que, en cardiomiocitos de ratón en cultivo, la aldosterona es capaz de inducir el crecimiento de los cardiomiocitos y la migración de fibroblastos, lo que podría conducir al remodelado y fibrosis del miocardio.³²³ El bloqueo del receptor de la AngII (AT1-R) mediante el uso de antagonistas (ARAI) revierte el efecto de la AngII en cardiomiocitos de rata, e incluso tiene un efecto cardioprotector.^{320,324} El ARAII telmisartán ha demostrado mejorar la fibrosis cardíaca inducida por la hiperglucemia en corazones de rata con diabetes mellitus de tipo I, mientras que el ARAII losartán puede atenuar el remodelado cardíaco en modelos murinos de diabetes crónica, y su tratamiento crónico en ratas hipertensas es capaz de revertir el remodelado eléctrico y de acortar la duración del potencial de acción en el miocardio.^{325–327} Por su parte, el tratamiento con el ARAII candesartán en cardiomiocitos de ratas diabéticas parece ejercer un efecto protector frente a las alteraciones de la función contráctil inducidas por la diabetes.³²⁸ Otro ARAII, el olmesartán, ha demostrado inhibir la hipertrofia cardíaca no solo a través del receptor AT1-R, sino también mediante la mejora del eje ECA2/Ang(1-7)/receptor Mas y el descenso en la producción de especies reactivas de

oxígeno en cardiomiocitos de modelos experimentales murinos.³²⁹

El silenciamiento de la ECA disminuye la apoptosis y mejora la recuperación de la isquemia/reperfusión mediante el bloqueo del SRAA de cardiomiocitos de rata en cultivo,³³⁰ y el uso de inhibidores de la ECA (IECAs) también ha demostrado tener efectos beneficiosos en cardiomiocitos: el enalapril ha demostrado atenuar el remodelado cardíaco en ratas con diabetes crónica,³²⁶ y reducir el remodelado eléctrico en el corazón de conejos.³³¹ En ratones que sobreexpresan a nivel cardíaco la ECA y que son proclives a desarrollar taquicardia ventricular y muerte súbita, el tratamiento con captopril (IECA) o losartan (ARAI) se ha asociado con un descenso en el riesgo de sufrir arritmias y con una mejora en la supervivencia, mediante el aumento del número y la fosforilación de la conexina 43 en el miocardio.³³²

La inhibición del receptor de mineralocorticoides tiene igualmente efectos beneficiosos a nivel del miocardio, puesto que el uso de los antagonistas espironolactona y BR-4628 ha demostrado inhibir el remodelado cardíaco inducido por la aldosterona en cardiomiocitos de rata.³³³ Además, el tratamiento con espironolactona también ha sido capaz de reducir la acumulación de colágeno en el miocardio y prevenir la fibrosis cardíaca en ratas hipertensas.³³⁴

Si bien a día de hoy nuestro estudio es el único que ha investigado la relación entre la inhibición del SRAA y el metabolismo lipídico y del colesterol en cardiomiocitos, la activación del SRAA y su relación con el metabolismo de lípidos ya había sido descrita anteriormente en experimentos llevados a cabo en ratones deficientes en la producción de angiotensinógeno, en los que se había observado que tenían reducidos los niveles de triglicéridos y colesterol en plasma debido a un descenso en la síntesis de lípidos y a un incremento de la actividad motora.³³⁵ Además, en ratas obesas la inhibición de la ECA mediante el tratamiento con ramipril ha demostrado reducir la acumulación de lípidos en el miocardio y mejorar la función ventricular; mientras que el bloqueo del receptor de mineralocorticoides mediante el uso de la epleronona atenúa la esteatosis y apoptosis cardíaca en ratas obesas y diabéticas.³³⁶⁻³³⁸ Varios estudios han sugerido que el SRAA tiene efectos importantes sobre el metabolismo lipídico en el tejido adiposo,³³⁹ y se ha podido demostrar asimismo que los ratones que carecen del gen de la ECA poseen un porcentaje de grasa corporal menor y un gasto energético mayor con respecto a ratones

normales.³⁴⁰ También se ha observado un descenso sustancial en la grasa corporal en ratones con diabetes de tipo II tratados con aliskiren,³⁴¹ y en ratones con obesidad inducida por la dieta el aliskiren puede reducir la ganancia de peso corporal, la adiposidad y los niveles en plasma de leptina.²⁷⁶ Además, la activación del SRAA en tejido renal ha sido vinculado a desórdenes lipídicos y acumulación de tejido adiposo en ratas.³⁴²

En estudios llevados a cabo en adipocitos humanos y de ratón se ha observado que la AngII puede inhibir de forma directa la lipólisis e incrementar la actividad de la sintasa de ácidos grasos.³⁴³ Igualmente, se ha podido comprobar en ratas que sobreexpresan el gen de la renina humana, que a la larga desarrollan obesidad e intolerancia a la glucosa no estando estos cambios metabólicos relacionados con la AngII, y planteándose así la posibilidad de la existencia de un sustrato desconocido para la renina, aparte del angiotensinógeno, que podría desempeñar una función importante en la homeostasis energética.³⁴⁴ Por lo tanto, el incremento en la captación de ácidos grasos por los cardiomiocitos y la expresión de genes implicados en el procesamiento intracelular de lípidos que hemos observado tras el tratamiento con el inhibidor directo de la renina aliskiren, podrían deberse bien a la inhibición del SRAA o bien a la inhibición de una ruta alternativa que incluya a un hipotético nuevo sustrato de la renina.

Nuestros resultados muestran que el aliskiren modifica la expresión de varias enzimas estrechamente relacionadas con el metabolismo de los lípidos, y estas observaciones están estrechamente correlacionada con nuestros datos funcionales que muestran que el aliskiren induce la captación de ácidos grasos y la redistribución de CD-36 y GLUT-4 en cardiomiocitos en cultivo. Los transportadores GLUT-4 y CD-36 circulan de forma dinámica entre los compartimentos subcelulares y la membrana plasmática en los cardiomiocitos, incrementando la captación de glucosa y ácidos grasos respectivamente.³⁴⁵ GLUT-4 es una proteína de membrana que se transloca a la membrana plasmática en respuesta a estímulos extracelulares como la insulina o a un incremento en la contractilidad del miocardio, aumentando así la captación de glucosa.³⁴⁶ A nivel cardíaco GLUT-4 desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis energética y las alteraciones en su expresión o función se encuentran relacionados con la resistencia a la insulina y la diabetes.^{346,347} Por su parte, CD-36 es una glicoproteína transmembrana que juega un papel clave a nivel

cardiomiocitario, ya que es responsable de la captación de aproximadamente entre el 50 y 70% de ácidos grasos por parte de este tipo celular.^{299,346} Aunque los cardiomiocitos son metabólicamente flexibles, en condiciones fisiológicas normales en individuos adultos, los ácidos grasos son el sustrato energético principal del corazón, por lo que los cambios en la función o los niveles del transportador CD-36 implican una alteración del metabolismo del miocardio, y en consecuencia una alteración en su expresión aparece vinculada frecuentemente a la fisiopatología de ciertas enfermedades cardiometabólicas como la aterosclerosis, la trombosis, la resistencia a la insulina y los estados inflamatorios.^{299,346-349} Por tanto, nuestros resultados sugieren que CD-36 podría ser un ejecutor del efecto funcional de aliskiren en el aumento de la captación de ácidos grasos que observamos en nuestros experimentos.

En el corazón adulto sano, el equilibrio entre los ácidos grasos y el metabolismo de los carbohidratos está estrechamente controlado para optimizar la producción de energía.³⁵⁰ En el miocardio la preferencia del sustrato energético está estrechamente regulada, aunque hay estudios que sugieren que, en patologías como la insuficiencia cardíaca, existe un cambio en la utilización del sustrato que conlleva una disminución en la utilización de ácidos grasos hacia un aumento del uso de glucosa.³⁵¹ La insuficiencia cardíaca es un síndrome complejo que representa el estadio final de diversas enfermedades cardiovasculares, y la disfunción metabólica asociada constituye un proceso sistémico que presenta una interacción compleja entre el miocardio y los tejidos y órganos periféricos, y que no solo implica cambios en la utilización del sustrato, sino que incluye alteraciones como la resistencia a la insulina, defectos en la producción de energía y un desequilibrio en los procesos anabólicos y catabólicos que conducen a la caquexia (estado de desnutrición, atrofia muscular y debilidad).³⁵² Cada una de estas anomalías metabólicas está asociada con una morbilidad y mortalidad significativas en pacientes con insuficiencia cardíaca y, sin embargo, su detección y manejo terapéutico sigue siendo un reto a pesar de la mejora en el diagnóstico y tratamiento (IECAs, beta bloqueantes, antagonistas de la aldosterona, etc.);³⁵³ por lo tanto, existe una clara necesidad de buscar nuevas alternativas y dianas terapéuticas, y en los últimos años se ha sugerido que las alteraciones en el metabolismo cardíaco podrían ser susceptibles de una intervención farmacológica, en un intento de corregir los desequilibrios metabólicos asociados a esta patología, la más prevalente entre las enfermedades cardiovasculares.³⁵³ Se ha propuesto asimismo la regulación de genes y/o enzimas responsables del control

del metabolismo de los ácidos grasos en el corazón (por ejemplo los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), las proteínas mitocondriales que metabolizan los ácidos grasos, la AMPK y los transportadores de ácidos grasos y glucosa) como una nueva diana terapéutica en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.³⁵¹

Hemos centrado nuestro estudio en el concepto de que un fármaco antihipertensivo como el aliskiren, un inhibidor directo de la renina que actúa a través de la supresión del SRAA, puede también afectar otros procesos fisiológicos clave como en este caso el metabolismo de nutrientes en células altamente especializadas como los cardiomiocitos. Como se ha mencionado, la regulación en el transporte de ácidos grasos a través de la membrana plasmática de los cardiomiocitos es esencial para el correcto funcionamiento cardiovascular, y su desregulación puede desembocar en un estado de lipotoxicidad en el miocardio.^{346,354} Sería necesaria la realización de más experimentos enfocados a la cuantificación de los niveles intracelulares y tasas de oxidación de ácidos grasos en los cardiomiocitos tratados con aliskiren, con el fin de determinar si el aumento observado en la captación de ácidos grasos inducida por este fármaco es beneficioso o perjudicial.

Nuestros resultados muestran que la expresión de la enzima intracelular Rrad (Ras-related associated with diabetes), una pequeña GTPasa necesaria para el acoplamiento de excitación-contracción y la señalización beta adrenérgica en el corazón,³⁰⁵ se encontraba disminuida por el aliskiren en cardiomiocitos. Aunque los estudios previos centrados en los efectos de Rrad en el metabolismo cardíaco son escasos, se ha demostrado que la mejora en la señalización de GMPc promueve la síntesis de triglicéridos en cardiomiocitos.³⁵⁰ La señalización a través de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) es un tipo de regulación esencial en actividades como la β -oxidación (producción de energía) y la esterificación de triglicéridos (almacenamiento) de ácidos grasos, que son fundamentales en la homeostasis cardíaca.³⁵⁰ La alteración en los niveles de Rrad se encuentra vinculada a estados patológicos: su expresión se encuentra aumentada en músculo esquelético tanto de pacientes con diabetes mellitus de tipo II con o sin obesidad como de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica, donde el estrés oxidativo estimula la sobreexpresión de Rrad.³⁵⁵⁻³⁵⁷ Además, niveles elevados de este gen también se encuentran asociados con un descenso en la captación de glucosa estimulada por la insulina en células musculares y adipocitos en cultivo,³⁵⁶ así como también con las alteraciones en el metabolismo de lípidos características de la diabetes

de tipo II en modelos experimentales *in vivo*.³⁵⁸ Por lo tanto, el descenso que observamos en la expresión de Rrad provocado por el tratamiento con aliskiren estaría en concordancia tanto con estudios previos como con el aumento en la captación de ácidos grasos inducida por aliskiren que hemos observado.

Nuestros resultados en relación a la enzima Pdk4 (pyruvate dehydrogenase kinase 4), que se sabe que suprime la oxidación de glucosa e incrementa la utilización de ácidos grasos,³⁵⁹ concuerdan con los obtenidos por otros investigadores en ratones que sobreexpresan de forma selectiva Pdk4 en el corazón, y que mostraban que un aumento en el catabolismo de ácidos grasos y una disminución en la oxidación de la glucosa se asocian con niveles elevados de esta molécula.³⁶⁰

Insig1 (Insulin induced gene 1) es una proteína regulada por la insulina que desempeña funciones importantes en la regulación de la homeostasis del colesterol y ácidos grasos.³⁶¹ En células musculares lisas de endotelio vascular, el uso de agentes antiinflamatorios (rapamicina) inhibe la síntesis de colesterol endógeno inducida por el estrés inflamatorio mediante el aumento de la expresión de Insig1,³⁶² confiriéndole una función antiadipogénica.^{363,364} Experimentos llevados a cabo con ratones deficientes en la producción de Insig1 han demostrado que tienen elevado el colesterol y triglicéridos hepáticos,³⁶⁵ y en estudios previos llevados a cabo con pacientes el tratamiento con aliskiren demostró reducir los niveles plasmáticos de colesterol LDL.³⁶⁶ Por tanto, el aumento que observamos en la expresión cardíaca de Insig1 provocado por el aliskiren podría estar relacionado con una mejora del perfil lipídico como el que se ha observado en estudios llevados a cabo con ratas diabéticas.²⁷⁷

Por su parte, Lpin1 es una enzima involucrada en el control de la síntesis de triglicéridos y glicerofosfolípidos, y en el núcleo celular actúa como un coregulador transcripcional, interactuando con factores de transcripción para activar o reprimir la transcripción de genes específicos como PPAR- α (receptor activado por proliferadores de peroxisomas α) y activar la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria.³⁶⁷ En músculo esquelético humano la deficiencia en la expresión de Lpin1 está involucrada en distrofias musculares, rabdomiólisis y procesos inflamatorios.³⁶⁸ Lpin1 se expresa de manera notable a nivel del miocardio, y sus niveles se regulan en respuesta a estímulos fisiológicos o fisiopatológicos, afectando de este modo al metabolismo de ácidos

grasos.³⁶⁹ La deficiencia en *Lpin1* se encuentra asociada a patologías metabólicas severas como las lipodistrofias, la resistencia a la insulina o la disfunción cardíaca de origen metabólico en ratones, y los defectos en la oxidación de ácidos grasos, la rabdomiólisis o el daño del músculo cardíaco de origen metabólico en humanos.^{370,371} Además, la disminución de la expresión de *Lpin1* puede contribuir a un empeoramiento del perfil metabólico como se ha observado en condiciones de resistencia a la insulina en tejido adiposo humano,³⁷² en el miocardio de ratas con diabetes mellitus de tipo II y tejido auricular de pacientes con diabetes mellitus de tipo II.³⁷³ Por lo tanto, el incremento en los niveles de *Lpin1* que observamos en nuestros resultados podría tener un efecto favorable en la homeostasis lipídica en cardiomiocitos, puesto que se ha podido observar en ratones que *Lpin1* regula el metabolismo y oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria del hígado y músculo esquelético, y la disminución de su expresión se encuentra asociada a importantes patologías metabólicas a nivel cardíaco en ratones.³⁷⁰

De forma adicional, en los estudios de confirmación de los resultados del microarray de genoma completo de rata, en los que se analizaron los genes cuya expresión se encontraba alterada por el tratamiento con aliskiren, se incluyó el gen con el segundo mayor cambio en la expresión (disminución de 2.16 veces respecto al control) y el *p* valor más bajo: *Arid5a* (AT-rich interactive domain-containing protein 3A), un miembro de la familia de proteínas con un dominio de interacción rico en AT, cuyos miembros se caracterizan por su capacidad para unirse preferentemente a secuencias AT en el ADN y están implicados en la regulación del crecimiento, la diferenciación, el desarrollo, la inflamación (*Arid5a* y *Arid5b* contribuyen al aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias) y el metabolismo de los triglicéridos, como se ha comprobado en modelos murinos *in vivo* y en células humanas *in vitro*.^{308,309,374,375} *Arid5a* se expresa de forma abundante en el corazón humano, donde actúa como un correpresor del receptor de estrógeno alfa.³⁷⁴ Teniendo en cuenta que los estrógenos desempeñan acciones complejas sobre el sistema cardiovascular, y la ausencia de estudios del papel de *Arid5a* a nivel metabólico y cardiovascular, nuestros datos de expresión merecen una mayor investigación para intentar determinar las implicaciones del descenso en la expresión de *Arid5a* por aliskiren en la función y metabolismo de los cardiomiocitos.

Las alteraciones en el contenido y la localización intracelular de las proteínas implicadas en la captación y el transporte de ácidos grasos pueden comprometer la función cardiaca.³⁷⁶ Asimismo, las patologías cardíacas pueden dar lugar a alteraciones en la expresión y/o localización de estas proteínas implicadas en el metabolismo de ácidos grasos.³⁷⁶ Serían necesarios estudios adicionales para intentar aclarar de forma más precisa la relación entre los cambios provocados por el aliskiren en las proteínas implicadas en el metabolismo y el transporte de lípidos, y la función cardíaca en condiciones normales y patológicas, ya que estos datos podrían ayudar a diseñar nuevas estrategias terapéuticas en el uso de este fármaco. Por este motivo, creemos que los resultados de nuestro estudio pueden ser de utilidad como punto de partida para la interpretación y la integración de muchas respuestas a nivel intracelular que pueden ser desencadenadas por aliskiren, un inhibidor directo de la renina del que previamente se consideraba que tenía solo efectos antihipertensivos mediados por la inhibición del SRAA. Si los efectos adicionales del aliskiren que hemos descrito están mediados también a través de la inhibición del SRAA, o por otros mecanismos todavía desconocidos está todavía por determinar, pero es evidente que este fármaco puede regular funciones a nivel cardiomiocitario (y potencialmente en otros tipos celulares) tan importantes como el metabolismo de lípidos.

Con respecto a la regulación y aumento de la expresión de enzimas implicadas en la biosíntesis del colesterol inducidos por aliskiren que hemos observado en células cardíacas, también merece una mayor investigación, puesto que se ha observado en modelos experimentales murinos que el tratamiento con aliskiren parece tener efectos beneficiosos con respecto al metabolismo del colesterol y en la progresión de la aterosclerosis, y en pacientes con hipertensión arterial la monoterapia con aliskiren mejora la estabilización de las placas ateroscleróticas de una forma más completa que con tratamientos con IECAs o ARAII.^{151,377} Además, el tratamiento con aliskiren ha demostrado disminuir de forma significativa los niveles plasmáticos de colesterol LDL en pacientes.³⁶⁶

En nuestros resultados observamos que el tratamiento con aliskiren induce un aumento en la expresión de las enzimas Hmgcs1 (Hidroximetilglutaril-CoA sintasa 1 citosólica) y Hmgcr (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa). La Hmgcs1 es el punto de partida en la vía del mevalonato o vía isoprenoide, que conduce a la síntesis del grupo

hemo, la vitamina K, la coenzima Q10, el colesterol y todas las hormonas esteroideas.³⁷⁸ Por su parte, la Hmgcr es una enzima clave en la vía metabólica del mevalonato: es la diana terapéutica de las estatinas (grupo de fármacos que reducen el colesterol) y su inhibición ha demostrado efectos beneficiosos a nivel cardiovascular como la mejora en la fibrosis, reducción del daño por isquemia en el miocardio o la mejora en la función de las células musculares lisas de la vasculatura.^{379,380} Sin embargo, la inhibición de la actividad de la Hmgcr también ha resultado ser perjudicial y el uso de estatinas también ha demostrado efectos negativos como el incremento de la resistencia a la insulina, riesgo de padecer diabetes mellitus de tipo II, miotoxicidad y un aumento de la apoptosis debido a la inhibición en la síntesis de los productos metabólicos generados por la Hmgcr.^{378,381-383} El bloqueo de la actividad de la Hmgcr inhibe el paso de HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A) a ácido mevalónico y aunque este es un paso fundamental en la síntesis de colesterol, la vía metabólica del mevalonato queda bloqueada, lo que conduce a un descenso en la síntesis de otros productos de esta ruta que son fundamentales para el correcto funcionamiento celular.³⁷⁸ Este es el caso de la ubiquinona o coenzima Q10, que es un componente fundamental de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, y se ha observado que la disminución en su biosíntesis está asociada a una disfunción muscular.³⁷⁸ Por lo tanto, nuestros resultados podrían ayudar a enfocar las implicaciones que puede tener el uso del aliskiren en terapia combinada con tratamientos enfocados a reducir el colesterol, como por ejemplo las estatinas.

Las enzimas Fdft1 (farnesil-difosfato farnesil transferasa 1), Lss (lanosterol sintasa) y Dhcr7 (7-dehidrocolesterol reductasa) están implicadas en los últimos pasos de la síntesis de colesterol dentro de la vía del mevalonato, y su expresión también se encontraba incrementada por el aliskiren. A día de hoy, no podemos evaluar si el incremento en la expresión de enzimas implicadas en la regulación de la ruta de síntesis del colesterol, observado a nivel cardiaco, es perjudicial o por el contrario tiene efectos beneficiosos. Uno de los pocos trabajos sobre el metabolismo del colesterol en cardiomiocitos ha demostrado que la inducción de la vía de colesterol causaba un incremento dramático en la farnesilación y asociación a la membrana de la proteína Ras, la cual regula proteínas que controlan la transducción de señales y la excitabilidad, concretamente en el aumento de la respuesta parasimpática/simpática.³⁸⁴ Además, en cardiomiocitos ventriculares de rata, se ha visto que el colesterol regula la función de los canales de

Ca^{2+} tipo-L, que es fundamental para el acoplamiento del proceso de excitación-contracción.³⁸⁵ Como se muestra en la red en la Figura 26, las enzimas relacionadas con el metabolismo de los lípidos y biosíntesis del colesterol modificadas por el tratamiento con aliskiren en cardiomiocitos están estrechamente relacionadas. Nuestros datos constituyen un punto de partida para profundizar en el estudio de la integración del aumento de la expresión de enzimas de la ruta de síntesis del colesterol con el control del anabolismo y/o catabolismo de lípidos en cardiomiocitos.

Este trabajo se ha centrado en los cambios en el metabolismo de los ácidos grasos y lípidos que se inducen tras el tratamiento con aliskiren en cardiomiocitos en cultivo. Sin embargo, también se encontraron otros datos de interés en el análisis funcional del microarray mediante el uso de IPA (Tabla 2). Se identificaron alteraciones inducidas por el aliskiren en la expresión de genes cuyos productos proteicos son conocidos por estar implicados en procesos fisiopatológicos que conducen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Uno de estos ejemplos ha sido la disminución en la expresión de la proteína fosfatasa dual específica (DUSP6) (su expresión se encontraba reducida 1.32 veces con respecto al control con una significatividad de $p < 0.01$), que actúa como un regulador negativo de ERK1/2 y cuya sobreexpresión en corazón ha sido asociada con una inducción de la insuficiencia cardíaca en experimentos llevados a cabo en ratones.³⁸⁶

Otro de los genes que presentaban una disminución de la expresión (1.32 veces con respecto al control y una significatividad de $p < 0.01$) era el factor de crecimiento de tejido conectivo (Ctgf) que participa en diferentes procesos como la regulación del ciclo celular, la migración y la adhesión celular, y cuya sobreexpresión se ha asociado a diferentes patologías renales y a procesos de remodelado y fibrosis cardíaca.^{387,388}

Se ha descrito que los cardiomiocitos, incluso del mismo tipo que los utilizados en este trabajo,^{389,390} poseen todos los componentes de un SRAA intracelular,^{391,392} y que la pro-renina se une a la superficie celular a través de los receptores (P)R e Igf2r/M6P.³⁹³ Se ha encontrado que (P)RR se encuentra sobreexpresado en modelos murinos de diabetes³⁹⁴ y en ratas transgénicas que sobreexpresan (P)RR humano se ha podido comprobar un aumento significativo en la elevación de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca.³⁹⁵ Por otro lado, su activación se sabe que induce la señalización

intracelular por al menos dos vías, una que conduce a la producción de AngII, y que es inhibida por aliskiren,^{255,396,397} y otra que es la independiente de AngII, y que no es inhibida por aliskiren.^{148,344,398} Por su parte, la activación del receptor Igf2r/M6P no conduce a la generación de angiotensina.^{393,399,400} Puesto que se ha sugerido que la señalización de la pro-renina/renina puede tener efectos a nivel cardiaco independientes de la producción de la AngII,¹⁴⁸ nuestro objetivo fue determinar si el aliskiren podría afectar a los niveles de expresión de los receptores a los que se une la pro-renina y renina, y la señalización intracelular posterior a la activación de (P)RR, concretamente, la fosforilación de ERK1/2 que se desencadena después de la unión de la renina a (P)RR.⁴⁰¹ Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con aliskiren no alteraba los niveles de expresión de ARNm de los receptores (P)RR o Igf2r/M6P. Además, hemos podido confirmar que el tratamiento de los cardiomiocitos con renina no producía alteraciones en la fosforilación de ERK1/2 (datos no mostrados), de acuerdo con estudios previos en donde se confirmó que la pro-renina no provoca cambios en el estado de fosforilación de ERK1/2 a nivel cardiomiocitario.¹⁴⁸ Sin embargo, en nuestro estudio el tratamiento con aliskiren sí fue capaz de provocar un aumento significativo de la fosforilación de ERK1/2 en cardiomiocitos en cultivo, lo que sugiere que (P)RR podría ser activado sin afectar a sus niveles de expresión. Existen trabajos en los que se ha podido observar que el aliskiren reduce la expresión del ARNm de (P)RR en el riñón *in vivo* pero no en células renales *in vitro*,^{290,398} Sin embargo en trabajos desarrollados en podocitos humanos se ha comprobado que el tratamiento con aliskiren no modificaba los niveles de expresión de (P)RR mientras que la fosforilación de ERK1/2 se encontraba disminuida por el tratamiento.²⁸⁸ El mecanismo mediante el cual el aliskiren incrementa la fosforilación de ERK1/2 en cardiomiocitos se desconoce, y en este trabajo hemos realizado experimentos con aliskiren tanto en presencia como ausencia de renina exógena sin hallar diferencias en la fosforilación de ERK1/2 (Figura 23). Una posible explicación es que la renina sea producida por los cardiomiocitos y permanezca en el citoplasma donde interactúa con el aliskiren.⁴⁰² Otra posible vía sería a través de Ras (reguladores moleculares de una gran variedad de vías de señalización celular) y la ruta metabólica del colesterol, puesto que Ras es un regulador de la fosforilación de ERK1/2 y, a su vez, se regula a sí mismo por la vía del colesterol.³⁸⁴ Por lo tanto, el aliskiren podría inducir la activación de ERK1/2 y los cambios metabólicos que hemos descrito a nivel del (P)RR, de la renina intracelular o mediante un mecanismo sin identificar e independiente del SRAA.²⁸⁸ Por todo ello, el

mecanismo específico por el que el aliskiren ejerce su acción debería ser uno de los objetos de estudio sobre este fármaco en trabajos futuros.

Por último, nuestros resultados no nos permiten definir el nexo de unión entre los efectos en la fosforilación de ERK1/2 inducida por el aliskiren y los efectos funcionales de este fármaco en cardiomiocitos. Se ha demostrado que la activación de la vía ERK1/2 se encuentra implicada en la regulación del metabolismo de ácidos grasos a nivel cardíaco⁴⁰³ y en el incremento de CD-36 en la membrana plasmática inducido por la contracción y la captación de ácidos grasos en miocitos de rata.⁴⁰⁴ Estos hallazgos podrían constituir un vínculo con nuestros resultados funcionales donde el tratamiento con aliskiren estimula la captación de ácidos grasos e incrementa la fosforilación de ERK1/2. Sin embargo, no podemos concluir que la fosforilación de ERK1/2 sea necesaria en el incremento de la captación de ácidos grasos y los cambios en la localización de CD-36 y GLUT-4 que observamos con el tratamiento con aliskiren en cardiomiocitos.

En resumen, en cultivos de cardiomiocitos murinos y humanos el aliskiren posee acciones importantes a nivel regulatorio en diferentes áreas del metabolismo. Algunos de los mecanismos por los que estas acciones se producen siguen sin estar claros, lo que pone de relieve la complejidad del SRAA. Nuestro estudio plantea cuestiones fundamentales en la investigación de los efectos metabólicos del aliskiren y su relación con la protección de órganos y el acoplamiento excitación-contracción. Una limitación de este estudio es que quedarían por identificar los mecanismos de acción de los efectos metabólicos del aliskiren que hemos observado y, concretamente, si esos efectos están mediados por componentes del SRAA o son independientes de este sistema. Otra de las limitaciones ha sido la imposibilidad de repetir todos nuestros experimentos en cardiomiocitos humanos. Serían necesarias más investigaciones sobre los efectos metabólicos del aliskiren en cardiomiocitos murinos y humanos para poder establecer si la AngI y/o la AngII están involucradas y si el (P)RR es activado sin que se altere su expresión. El estudio de los mecanismos de acción del aliskiren en otros tipos celulares, en los que se ha visto que el SRAA afecta al metabolismo lipídico, podría contribuir a aclarar las vías por las cuales el aliskiren ejerce su efecto y que son comunes también a los cardiomiocitos.^{276,339-343} Finalmente, sería de vital importancia estudiar la posible vinculación de los mecanismos metabólicos de acción del aliskiren con la función

contráctil en los cardiomiocitos. Nuestros resultados son sin embargo relevantes a la hora de analizar los efectos de este fármaco antihipertensivo directamente sobre las células cardiacas; y pueden ayudar a conocer más en profundidad las implicaciones de una terapia continuada con fármacos de esta clase.





CONCLUSIONES

ALISKIREN



- 1.- El tratamiento con aliskiren no afecta a la viabilidad de los cardiomiocitos murinos en cultivo.
- 2.- El tratamiento con aliskiren induce cambios en la captación de ácidos grasos y glucosa mediante la modificación de la distribución de CD-36 y GLUT-4 en cardiomiocitos murinos en cultivo.
- 3.- El tratamiento con aliskiren no induce cambios en la expresión de (P)RR e Igf2r/M6P en cardiomiocitos en cultivo.
- 4.- El tratamiento con aliskiren modifica la expresión de enzimas clave en el metabolismo lipídico y biosíntesis del colesterol.







CHEMERINA



1.- Tejido adiposo

Es un órgano complejo que constituye la principal reserva de energía y compuesto por varios tipos celulares que a su vez poseen distintas funciones.¹⁴ El tejido adiposo almacena el exceso de energía en forma de triglicéridos que se movilizarán en períodos de ayuno mediante la lipólisis, los ácidos grasos una vez liberados pueden ser utilizados por diferentes órganos para la obtención de energía.¹⁴ El tejido adiposo se divide en dos tipos: tejido adiposo blanco y tejido adiposo pardo, con distinta localización y función.¹⁴

1.1.- Tejido adiposo pardo

El tejido adiposo pardo posee un papel determinante en la termorregulación y constituye alrededor de un 5% del peso corporal en recién nacidos, etapa en la que alcanza su máxima concentración en humanos.⁴⁰⁵ Este tipo de tejido está preservado en el resto de mamíferos, pero en humanos se ve reemplazado por tejido adiposo blanco.⁴⁰⁶ Aun así, se ha visto que los adultos poseen una importante cantidad de tejido adiposo metabólicamente activo localizado en las regiones supraclaviculares, paravertebrales, periaórticas, perirrenales y del cuello.^{406,407}

La función del tejido adiposo pardo es fundamentalmente termogénica, y no acumula lípidos como reserva de energía.⁴⁰⁸ Los adipocitos que componen el tejido adiposo pardo aglutinan los triglicéridos en vesículas en el citoplasma para posteriormente producir calor y mantener la temperatura corporal.⁴⁰⁸ Este proceso es posible en gran medida gracias a que este tipo de adipocitos expresan un tipo de proteína denominada termogenina (UCP1). Dicha proteína se encuentra en la membrana mitocondrial y su función es la de disminuir el gradiente de protones generado en la fosforilación oxidativa mediante el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna.⁴⁰⁹ Como consecuencia, se produce un desacoplamiento en la respiración mitocondrial donde la formación de ATP es mínima y la energía acumulada se disipa en forma de calor.⁴⁰⁹

1.2.- Tejido adiposo blanco

Prácticamente todas las especies animales, desde el *C. elegans* hasta el *Homo Sapiens*, han encontrado la forma de almacenar el exceso de energía como grasa para su futuro

uso.⁴¹⁰ En *C. elegans* y tiburones el almacenaje de la grasa ocurre en el epitelio intestinal e hígado respectivamente, ambos tejidos de origen endodérmico.¹⁴ Sin embargo, en la mayoría de especies el acúmulo de lípidos ocurre en un tejido de origen mesodérmico denominado tejido adiposo blanco, cuya localización varía entre especies.¹⁴ El tejido adiposo blanco constituye la mayor parte del tejido adiposo y su distribución en el cuerpo es dispersa pero se acumula principalmente en la zona visceral y subcutánea, y en menor medida en el músculo, riñón, región epicárdica y perivascular¹⁴ (Figura 31).

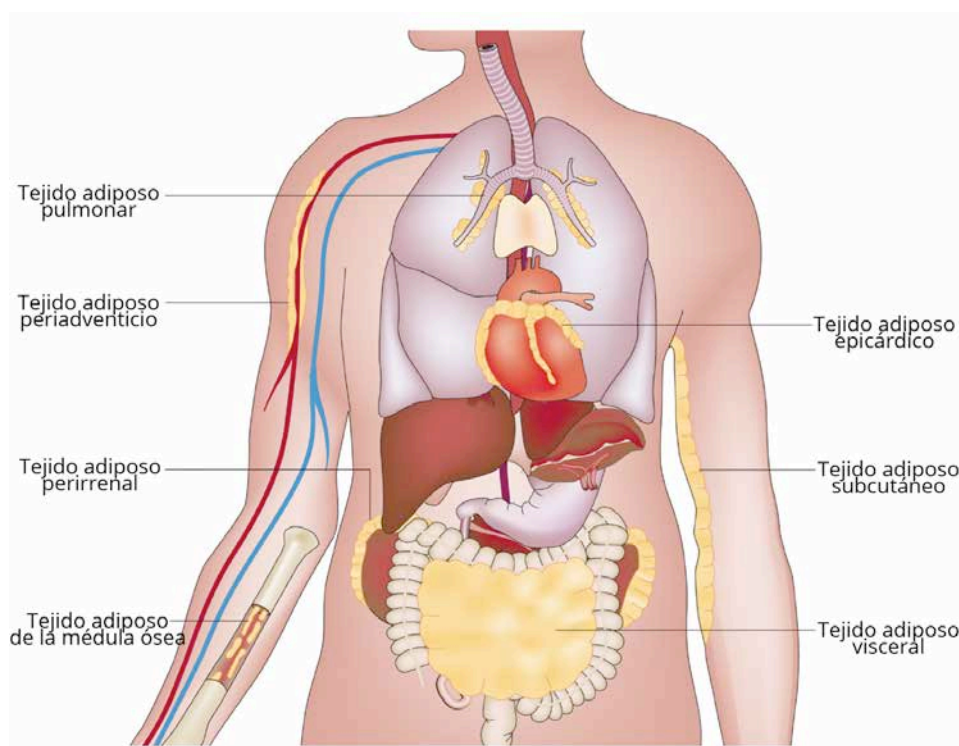


Figura 31: En los seres humanos, el tejido adiposo blanco se encuentra distribuido por todo el cuerpo aunque los depósitos subcutáneos e intrabdominales representan los principales compartimentos de almacenamiento. Bajo condiciones de obesidad el tejido adiposo blanco se expande en esos depósitos y otros como el corazón, los riñones y la adventicia de los vasos sanguíneos. La secreción diferencial de adipokinas por varios de estos depósitos de tejido adiposo puede afectar selectivamente a la función de determinados órganos y al metabolismo a nivel sistémico.⁸²

El tejido adiposo blanco se compone de diversos tipos celulares unidos por tejido conectivo vascularizado e innervado donde los adipocitos son las células mayoritarias pero también se encuentran presentes otros tipos celulares como preadipocitos, macrófagos, linfocitos, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales⁸² (Figura 32).

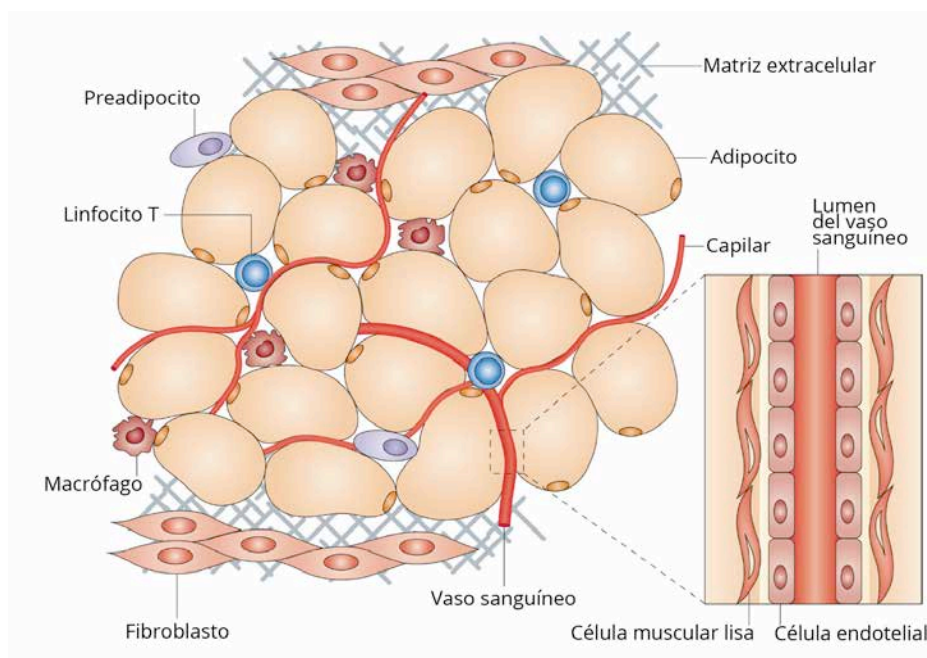


Figura 32: Composición del tejido adiposo blanco. Los adipocitos son el principal componente del tejido adiposo y desempeñan un papel crucial en el almacenamiento de energía y la actividad endocrina. Los preadipocitos, fibroblastos, células vasculares y células del sistema inmune están presentes como precursoras y constituyen la fracción del estroma vascular. Los vasos sanguíneos en el tejido adiposo es necesario para suministrar un flujo apropiado de nutrientes y oxígeno al tejido adiposo, así como permitir la distribución de las adipokinas secretadas por este. Los factores que secretan los diferentes componentes celulares del tejido adiposo son cruciales en el mantenimiento de la homeostasis en el propio tejido y en el resto del cuerpo.⁸²

La función del tejido adiposo blanco como almacén de energía se ve incrementada frente a un exceso de energía, en cuyo caso no sólo crecen en tamaño los adipocitos sino también en número.⁴¹¹ Dicha función se ve reducida cuando la energía es limitada, de esta forma, el tejido adiposo blanco juega un papel determinante en la regulación de la homeostasis energética.⁴¹¹ A nivel metabólico, después de la ingesta se incrementan los niveles de glucosa, lípidos e insulina, que conllevará un aumento en la formación de triglicéridos y su almacenamiento en el hígado y en el tejido adiposo.⁴¹¹ Al contrario, en períodos de ayuno los niveles de insulina descienden y se estimula la lipólisis y rotura del glucógeno.⁴¹¹

2.- El tejido adiposo blanco como órgano endocrino

En condiciones de exceso de energía, el tejido adiposo blanco es el mayor sitio de acúmulo de esta en forma de triglicéridos, durante los períodos de ayuno pueden ser movilizados mediante la lipólisis para su posterior salida al torrente sanguíneo para ser utilizados por otros órganos como combustible.⁴⁰⁵ Por lo tanto, el tejido adiposo juega un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis energética, y su

disfunción puede dar lugar a una serie de desórdenes metabólicos.⁴⁰⁵ La acumulación de triglicéridos es un factor crítico que conduce al desarrollo de obesidad, inflamación subclínica crónica y otras patologías asociadas como la diabetes mellitus de tipo 2 y enfermedades cardiovasculares.⁴¹²

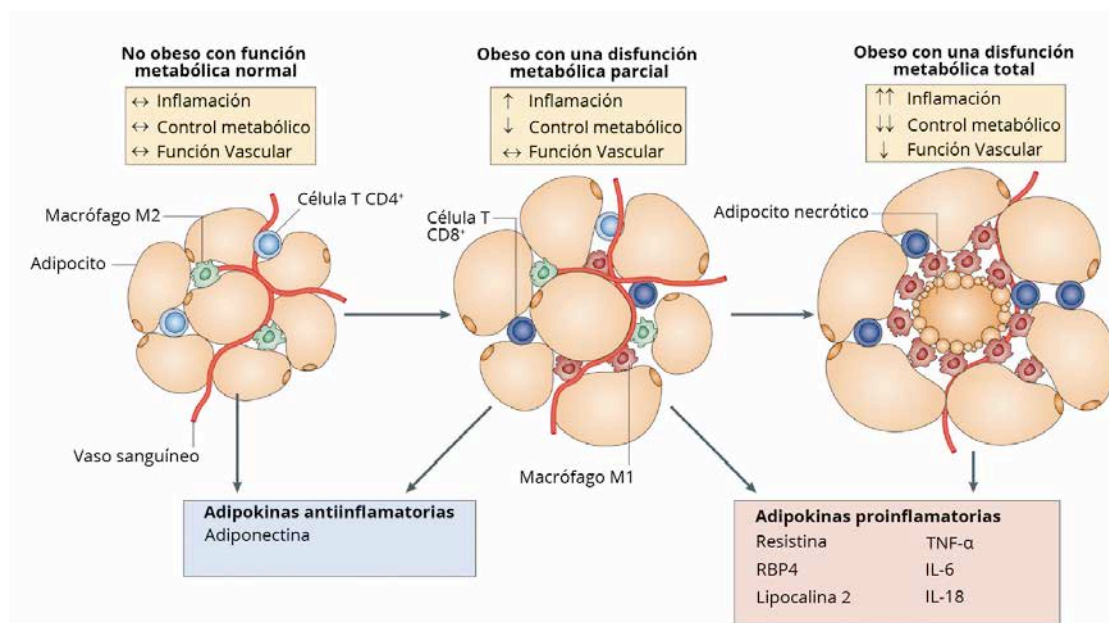


Figura 33: Modulación del fenotipo del tejido adiposo. A medida que se incrementa la obesidad el tejido adiposo sufre una transición hacia un fenotipo metabólicamente disfuncional, se produce un incremento en los niveles de necrosis de adipocitos, los macrófagos residentes en el tejido se activan y en consecuencia se produce un reclutamiento y acumulación de este tipo celular y otras células del sistema inmune en el tejido que produce un empeoramiento y un estado crónico de inflamación. El resultado es un tejido adiposo que, a medida que crece, comienza a generar un entorno inflamatorio, mediante el descenso en la producción de adipokinas antiinflamatorias y un aumento en la secreción de adipokinas y factores proinflamatorios.⁸²

El tejido adiposo blanco es un tejido conectivo laxo donde los adipocitos se rodean de una matriz extracelular que, en condiciones de obesidad sufre una constante remodelación para poder acomodar a los adipocitos hipertróficos que acumulan triglicéridos progresivamente, lo que a su vez conlleva problemas de vascularización e inervación que incrementan la secreción de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias que van a promover la infiltración de más células del sistema inmune en el tejido adiposo blanco.⁴¹² En esta situación de obesidad la infiltración de macrófagos aumenta en el tejido adiposo y estos a su vez secretan diferentes citoquinas proinflamatorias como la interleukina 1 (IL-1), la interleukina 18 (IL-18), la interleukina 6 (IL-6) o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) entre otras⁴⁰⁵ (Figura 33).

A medida que la obesidad se va desarrollando el tejido adiposo se vuelve cada vez más disfuncional y es incapaz de almacenar el exceso de energía de forma eficiente, de modo que secreta ácidos grasos no esterificados que se depositan ectópicamente en otros órganos y que conduce al resto del organismo a un estrés metabólico provocado por lipotoxicidad, alterando vías de señalización clave como la de la insulina.⁴¹³ Adicionalmente, en el tejido adiposo se produce una situación de inflamación crónica debida principalmente al aumento en la secreción de citoquinas proinflamatorias por parte de los macrófagos que, a su vez, provoca un desequilibrio en la producción de adipocinas y la señalización mediada por estas.⁴¹⁴ El tejido adiposo influye sobre otros órganos como el cerebro, el corazón, la vasculatura, el hígado y el músculo, a través de la secreción de adipocinas y otros factores, por lo que la alteración en la secreción de adipocinas conlleva importantes consecuencias a nivel metabólico que se manifestarán a través de la aparición de diversas patologías como la diabetes mellitus de tipo 2, la aterosclerosis, el síndrome metabólico, el riesgo cardiovascular y otros procesos inflamatorios^{82,412,414} (Figura 34).

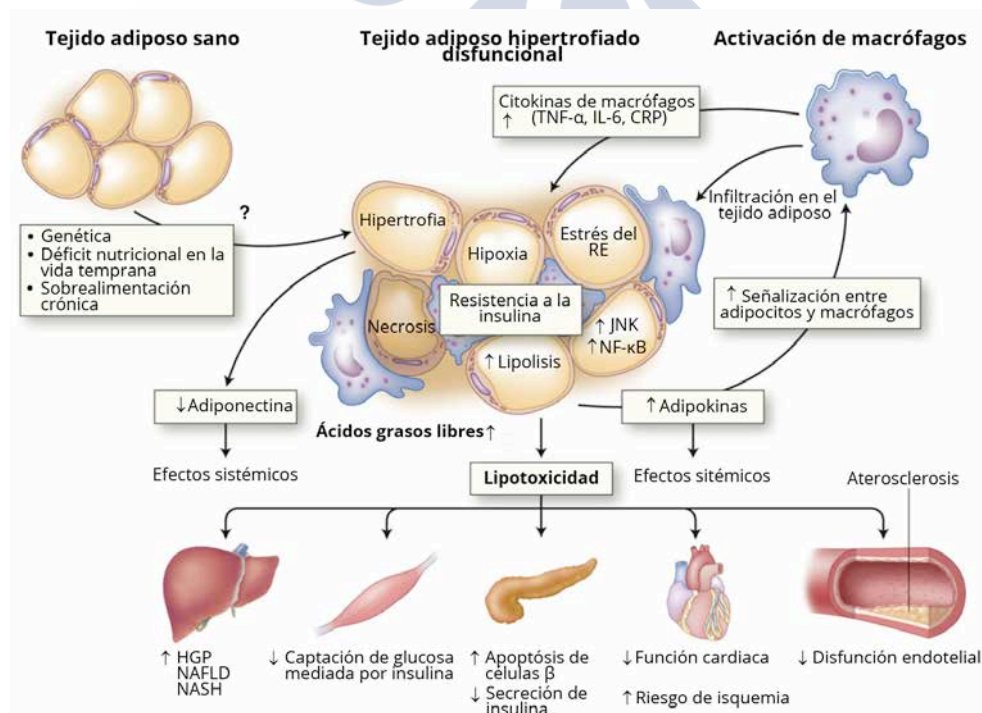


Figura 34: La biología normal de los adipocitos se ve modificada, aumenta su hipertrofia, la hipoxia y el estrés del retículo endoplasmático (RE). Esto provoca la activación de las vías inflamatorias y eventualmente la necrosis de los adipocitos. Todos estos eventos producen la activación de señales (liberación de citoquinas, adipocinas y otros factores) que desencadenan la infiltración a nivel local de macrófagos, perpetuando un estado inflamatorio crónico que conlleva a la aparición de la resistencia a la insulina de los adipocitos y provoca la liberación de ácidos grasos libres a los tejidos distantes tales como el músculo, el hígado, las células β pancreáticas, el corazón y a nivel vascular, resultando en la aparición del síndrome metabólico y un aumento en el riesgo de enfermedad cardiovascular. CRP: proteína C-reactiva, HGP: producción de glucosa hepática, JNK: c-Jun N-terminal quinasa, NAFLD: esteatosis hepática no alcohólica, NASH: esteatohepatitis no alcohólica, NF-κB: factor nuclear κB.⁴¹³

Por tanto, la perspectiva sobre el tejido adiposo ha cambiado sustancialmente a lo largo de los últimos años, ha pasado de ser un simple reservorio energético a desempeñar un papel clave en el metabolismo a nivel sistémico. Esta función metabólica es mediada, en parte, por su habilidad para secretar numerosas proteínas, factores que son secretados por el tejido adiposo blanco y que son colectivamente denominados como adipocitoquinas o adipokinas.^{415,416} Desde la identificación de la leptina como la primera adipokina hace más de dos décadas, se han seguido descubriendo nuevas proteínas secretadas por el tejido adiposo hasta aislar y caracterizar más de cincuenta tipos de moléculas entre las que se incluyen nuevas adipokinas como la chemerina.⁴¹⁷ Toda esta gran variedad de adipocitoquinas se engloban en diferentes familias que comprenden citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento entre otros.⁴¹⁸

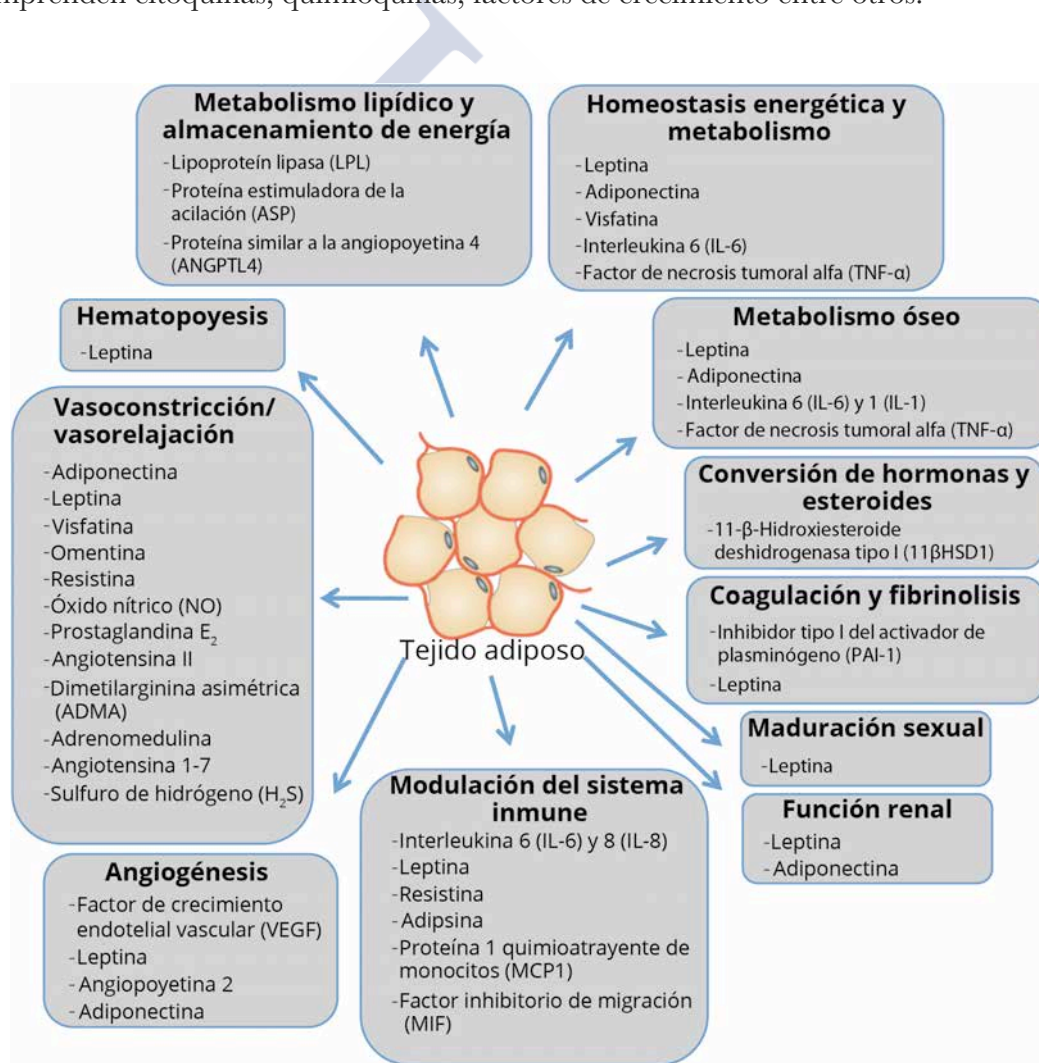


Figura 35: Principales adipokinas y otros productos de secreción del tejido adiposo y sus funciones.^{418,419}

Las adipokinas pueden actuar tanto a nivel local de forma autocrina/paracrina como a nivel sistémico de forma endocrina, regulando una gran cantidad de procesos biológicos.⁸² A nivel sistémico, las adipokinas ejercen efectos importantes en distintos órganos como el corazón, el músculo esquelético, el hígado, el páncreas, el cerebro e incluso a nivel vascular.⁸² Las adipokinas ejercen un papel determinante en la inflamación, a nivel cardiovascular y en la función endotelial, y además desempeñan un papel determinante a nivel metabólico, donde poseen una gran cantidad de funciones que afectan a la sensibilidad a la insulina, el gasto energético y la regulación del apetito^{10,82,414} (Figura 35).

El tejido adiposo blanco se distribuye principalmente a nivel subcutáneo y visceral aunque también se encuentra ampliamente disperso en menor cantidad por todo el cuerpo. El tejido adiposo visceral, epicárdico, perivascular y pulmonar son particularmente relevantes en desarrollo de las enfermedades cardiovasculares.^{10,37} Los depósitos de tejido adiposo no solo difieren en su localización sino que también presentan diferencias en cuanto a su composición a nivel celular, en la matriz extracelular, en la vascularización, la innervación, el metabolismo y sus productos de secreción.¹⁰

2.1.- Tejido adiposo visceral y subcutáneo

El tejido adiposo visceral se localiza en la cavidad abdominal, almacenada entre los órganos (estómago, hígado, intestinos, riñones etc.) e incluye la grasa mesentérica, omental, retroperitoneal, depósitos en el epidídimo y perirrenales.³⁷ Por su localización, la sangre venosa procedente del tejido adiposo visceral se dirige a través de la vena porta al hígado directamente lo cual proporciona la llegada al hígado de ácidos grasos libres y adipokinas secretadas por este tipo de grasa, dichas adipokinas intervienen en la producción de mediadores inflamatorios a nivel hepático.⁴²⁰ Por el contrario, el tejido adiposo subcutáneo se encuentra ubicado debajo de la piel, principalmente en la zona de los glúteos, caderas y piernas, y su irrigación se hace a través de venas sistémicas.³⁷

El tejido adiposo visceral y subcutáneo difieren en su perfil de secreción de adipokinas: en comparación con el tejido adiposo subcutáneo, el visceral secreta cantidades inferiores de adipokinas metabólicamente beneficiosas, incluyendo la leptina y

adiponectina, pero cantidades más altas de adipokinas perjudiciales o proinflamatorias tales como RBP4, TNF- α , MCP-1, IL-8 e IL-6.^{48,421} Por lo tanto, la obesidad abdominal se asocia con niveles reducidos de adiponectina y aumento de los niveles de adipokinas inflamatorias.⁴²²

La regulación lipolítica también es diferente entre los tejidos adiposos visceral y subcutáneo, el tejido adiposo visceral contiene un mayor número de adipocitos que el tejido adiposo subcutáneo y de mayor tamaño. Los adipocitos viscerales son metabólicamente más activos con una mayor capacidad lipolítica y, en comparación con las células adiposas subcutáneas abdominales o femorales, muestran mayor inducción de lipólisis por catecolaminas y una mayor reducción de la supresión de la lipólisis en respuesta tanto a la insulina como a los agonistas α 2-adrenérgicos, lo que origina resistencia frente al efecto antilipolítico de la insulina, alteración de los niveles circulantes de LDL y HDL y disfunción endotelial.⁴²³ El aumento de la capacidad lipolítica del tejido adiposo visceral también produce un aumento en la liberación de ácidos grasos libres que, aumentan potencialmente la gluconeogénesis hepática y contribuyen a la acumulación de lípidos a nivel ectópico en diversos tejidos, contribuyendo todo ello a un aumento de la resistencia a la insulina, de la inflamación y la predisposición a la aparición del síndrome metabólico.⁴²⁴

2-2.- Tejido adiposo epicárdico y perivascular

El tejido adiposo epicárdico que rodea el corazón es un subtipo del tejido perivascular que envuelve los vasos sanguíneos. Se encuentra localizado entre el pericardio y el miocardio e íntimamente ligado a este último sin ninguna estructura que lo aisle del músculo cardíaco, con el que comparte irrigación sanguínea, y participa en la regulación de homeostasis de los ácidos grasos a nivel de la microcirculación coronaria.^{425,426}

El tejido adiposo perivascular rodea los vasos sanguíneos en cantidad variable, actuando como soporte mecánico, reduciendo la torsión a nivel vascular y colaborando en el remodelado de los vasos sanguíneos.⁴²⁷ Estos depósitos son metabólicamente activos y ejercen una modulación protectora de la función vascular en individuos sanos pero, su expansión en la obesidad, puede tener efectos adversos y propiciar el desarrollo de trastornos protrombóticos, de lipotoxicidad y estados proinflamatorios.^{425,428}

El tejido adiposo epicárdico tiene efectos sobre las arterias coronarias y el propio miocardio a través de la mediación paracrina y la secreción de mediadores proinflamatorios y otras moléculas como el TNF- α , IL-1, IL-6 y otras adipokinas.^{425,429}

La obesidad conlleva un aumento en el contenido de tejido adiposo epicárdico y se ha visto que este incremento está relacionado con un mayor riesgo de sufrir diferentes tipos enfermedades cardiovasculares como hipertrofia cardíaca, fibrilación auricular e isquemia miocárdica.^{427,428}

El aumento del tejido adiposo produce una infiltración de grasa en el tejido cardíaco que puede causar daños que posibilitan el desarrollo de insuficiencia cardíaca y se ha postulado que el acúmulo progresivo de grasa entre las fibras musculares podrían causar la degeneración de los miocitos.¹⁵ Por su parte, el tejido adiposo perivascular es también una fuente de producción de adipokinas y otros factores que actúan a nivel paracrino/vasocrino.⁴²⁷ La grasa perivascular puede ejercer adicionalmente como un proveedor de energía y amortiguador de los niveles tóxicos de ácidos grasos libres en la circulación arterial.⁴²⁶

3.- Adipokinas y sus efectos sobre el sistema cardiovascular

El tejido adiposo produce numerosas adipokinas que actúan regulando no solo el propio tejido adiposo sino también comunicándose con el cerebro, corazón, vasculatura, hígado y músculo.¹⁰ Estas adipokinas poseen actividad tanto proinflamatoria como antiinflamatoria y su equilibrio es crítico en el mantenimiento de la homeostasis a nivel sistémico, el desequilibrio en los niveles de adipokinas que se produce debido a la disfunción del tejido adiposo en la obesidad contribuye al desarrollo de enfermedades cardiovasculares.¹⁰

- Leptina

Esta adipokina es expresada y secretada principalmente por los adipocitos del tejido adiposo blanco y, concretamente, es la grasa subcutánea su principal fuente de producción.^{430,431} La principal función de la leptina es la de reducir la ingesta e

incrementar el gasto energético, efectos mediados a través de sus receptores, localizados en diferentes núcleos hipotalámicos y en órganos como el páncreas, el hígado, tejido adiposo y músculo esquelético, actuando de forma autocrina/paracrina.^{419,432}

A nivel inflamatorio, el TNF- α o el lipopolisacárido (LPS) activan la expresión de la leptina y su receptor, y a su vez la leptina puede inducir la producción de moléculas proinflamatorias como el propio TNF- α , IL-6 e IL-12 mediante la activación de monocitos y macrófagos.⁴³³ La leptina parece estar implicada en diversas patologías como la resistencia a la insulina⁴³⁴ y el desarrollo de la artritis.⁴³⁵ A nivel cardiovascular se ha estudiado el papel de la leptina en el desarrollo de la aterosclerosis donde se ha podido comprobar que participa en el reclutamiento de leucocitos y macrófagos hacia la pared endotelial.⁴³⁶ Además, la leptina interviene en la formación de las placas de ateroma y la inducción en la producción de factores como el TNF α , IL-2 o IL-6, lo que a su vez provoca la disfunción endotelial a través del estrés oxidativo.⁴³⁷ En humanos, los niveles en suero altos de leptina están asociados con un incremento en el riesgo de infarto de miocardio, con independencia de la obesidad y los factores de riesgo cardiovasculares.⁴³⁸ A nivel cardiovascular los efectos de la leptina son principalmente negativos, favorece la aterosclerosis, aumenta la presión sanguínea y el riesgo de infarto de miocardio. Además favorece la inflamación vascular y disfunción del endotelio.⁸⁷

- Adiponectina

También conocida como Acrp30 o adipoQ, es una adipokina cuyos niveles plasmáticos son relativamente altos en comparación con otras hormonas.^{411,439} La adiponectina posee dos receptores: AdipoR1 y R2. AdipoR1 es muy abundante en el músculo esquelético y AdipoR2 en hígado.⁴³⁹ Los dos receptores son capaces de desencadenar la ruta de señalización de la proteína quinasa dependiente de adenosín monofosfato (AMP) (AMPK), la cual estimula las rutas catabólicas como la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos e inhibe las anabólicas como la gluconeogénesis y la síntesis de glucógeno, ácidos grasos y proteínas, regulando el gasto energético sin producir efectos sobre la ingesta.^{411,439} A nivel cardiovascular, la adiponectina funciona como una hormona antiaterogénica mediante la reducción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en las células endoteliales y mitigando la formación de placas de ateroma.^{46,411} La adiponectina participa en el remodelado cardíaco y protege frente al daño por isquemia/reperfusión.⁴⁴⁰ En humanos, los niveles en plasma de adiponectina se

correlacionan negativamente con la gravedad de la enfermedad coronaria arterial y la resistencia a la insulina.⁸⁷ La adiponectina posee propiedades antidiabéticas, cardioprotectoras y antiaterogénicas, se considera una adipokina que contribuye a una correcta función del endotelio vascular y reduce el riesgo de padecer enfermedades coronarias.^{87,441}

- Resistina

Es una adipokina que posee una estructura a nivel molecular parecida a la adiponectina y cuya expresión se encuentra elevada en estados de obesidad.^{411,442} Su función a día de hoy no parece clara debido a las diferencias entre los estudios en modelos murinos donde parece tener un efecto claro sobre la homeostasis de la glucosa y su producción está claramente localizada en los adipocitos mientras que en humanos sus efectos se relacionan más con la inflamación que con el metabolismo de la glucosa y su producción se da en los macrófagos y preadipocitos.^{411,442-444} En cuanto a su papel a nivel cardiovascular, la resistina parece poseer una implicación en los procesos proinflamatorios que conllevan a la disfunción endotelial y los niveles plasmáticos elevados de resistina se correlacionan positivamente con la aterosclerosis, el riesgo cardiovascular y con enfermedad coronaria en humanos.⁴⁴²

- Visfatina

Es una nueva adipokina que posee una elevada expresión en el tejido adiposo visceral de humanos y murinos. Posee propiedades antidiabéticas y a medida que se desarrolla la obesidad sus niveles plasmáticos también se ven incrementados. A nivel fisiológico la visfatina puede activar el receptor de la insulina y es capaz de activar la ruta de señalización fosfoinositol 3 kinasa/Proteín quinasa B (PI3K/AKT) produciendo un efecto hipoglucemiante: reduce la liberación de glucosa en el hígado y estimula su captación en miocitos y adipocitos en ratones.⁴⁴⁵ Estos resultados no han podido ser confirmados en humanos debido a que los estudios llevados a cabo han resultado contradictorios.^{444,446} En condiciones de isquemia/reperfusión la visfatina ha demostrado tener efectos cardioprotectores minimizando el tamaño de la zona infartada y es capaz de inducción de la relajación del endotelio vascular mediante la producción de óxido nítrico (NO) con implicaciones directas en la reducción de la presión arterial.^{87,447}

- Apelina

Es una adipokina que se expresa ampliamente en varios órganos como el tejido adiposo, el cerebro, el corazón y los pulmones.⁴⁴⁶ Esta hormona se origina tras el procesamiento proteolítico de su prepro péptido y da lugar a cuatro isoformas activas: apelina-12, 13, 17 y 36, cada una de las cuales posee diferente afinidad en la unión a su receptor, aunque la más abundante y con mayor actividad es la apelina-13.^{446,448} La apelina activa la cascada de señalización de PI3K/AKT y de quinasas reguladas por señal extracelular (ERK).⁴⁴⁶ En experimentos llevados a cabo con ratones, a los que se les indujo obesidad a través de una dieta alta en grasa, se ha podido comprobar que la apelina mejora la tolerancia a la glucosa e incrementa su utilización activando las rutas de señalización de AMPK y AKT, tanto en ratones normales como en aquellos con resistencia a la insulina.⁴⁴⁶ La apelina posee efectos en el sistema cardiovascular: en modelos murinos de aterosclerosis es capaz de limitar la formación de ateromas, y se ha visto que previene la formación de aneurismas aórticos a través de la limitación de la inflamación inducida por los macrófagos.⁸⁶ A nivel del endotelio vascular, la apelina promueve la producción de NO con el consecuente efecto vasodilatador de este y consecuente reducción de la presión arterial.⁸⁷

- Omentina

Es una proteína que se expresa y se secreta principalmente en el tejido adiposo visceral y en menor cantidad en el tejido adiposo subcutáneo, el intestino y en el endotelio.⁴⁴⁹ En estados de obesidad, los niveles circulantes en plasma de esta hormona y su expresión génica a nivel de tejido adiposo se encuentran reducidos y se correlacionan positivamente con los niveles en plasma de adiponectina y HDL y de forma negativa con el IMC y la resistencia a la insulina.⁴⁵⁰ Además, en humanos la omentina está relacionada con la activación de la ruta PI3K/AKT y por lo tanto con el aumento de la señalización de la insulina.⁴⁴⁹ La omentina, por lo tanto, podría estar implicada en la regulación del metabolismo energético y la sensibilidad a la insulina.⁴⁴⁹ A nivel cardiovascular, la omentina incrementa la producción de NO e induce vasodilatación en células endoteliales.⁸⁷ La omentina también se relaciona con la reducción de la inflamación a nivel vascular y de la disfunción endotelial, por lo que parece tener una función cardioprotectora.⁸⁷

- Grelina

La grelina no se produce en el tejido adiposo y por lo tanto no se considera una adipokina. Sin embargo es una hormona metabólica que desempeña funciones importantes en la homeostasis energética y la regulación de la ingesta.⁴⁵¹ La grelina es producida y secretada por cardiomiocitos humanos y de murinos en cultivo, donde parece tener un efecto paracrino/autocrino y protector frente a la apoptosis.⁴⁵² Además, también está implicada en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares;⁴⁵³ posee un efecto antihipertensivo,^{454,455} reduce la resistencia vascular periférica,⁴⁵⁶ mejora el remodelado ventricular⁴⁵⁷ y el daño a nivel cardiaco provocado por isquemia/reperfusión.⁴⁵⁸

- Nesfatina

La nesfatina-1 es un péptido derivado de la nucleobindina 2 (NUCB2) mediante el procesamiento proteolítico mediado por las prohormonas convertasas.⁴⁵⁹ Se expresa en regiones hipotalámicas como una hormona que induce anorexia,⁴⁵⁹ aunque se ha detectado adicionalmente en la mucosa gástrica,⁴⁶⁰ el páncreas⁴⁶¹ y el tejido adiposo,⁴⁵⁹ por lo que podría considerarse una adipokina aunque el tejido adiposo no sea su principal fuente de producción.⁴⁶² La nesfatina-1 actúa como una hormona pleiotrópica con múltiples acciones: en la homeostasis de la glucosa,⁴⁶³ el control del sueño,⁴⁶⁴ la regulación del estrés y la ansiedad⁴⁶⁵ e incluso en la regulación de la función cardiovascular.⁴⁶⁶ La nesfatina-1 es sintetizada por cardiomiocitos humanos y murinos en los que es capaz regular su metabolismo energético mediante la inducción en la movilización del transportador de glucosa GLUT4 y aumentar la captación de glucosa en dichos cardiomiocitos.^{467,468}

4.- El corazón como órgano endocrino

A lo largo de los últimos años la obesidad se ha asociado con un aumento significativo en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y muerte prematura.^{20,469} A partir del descubrimiento de la leptina, y la subsiguiente identificación de una amplia variedad de otras adipokinas, se ha podido establecer un claro nexo entre la obesidad y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.²⁰ Posteriormente, varios estudios han

profundizado en el papel que desempeña el corazón como órgano endocrino y, como componente fundamental y relevante de una compleja red que incluye también al sistema endocrino, nervioso e inmune.^{470,471}

Es por ello, que el corazón ha pasado a tener una consideración adicional como órgano endocrino puesto que se ha demostrado su capacidad para sintetizar y secretar determinadas hormonas.⁴⁷² Los primeros productos secretados por el corazón en ser identificados fueron los péptidos natriuréticos (atrial (ANP), cerebral (BNP) y tipo C (CNP)), con importantes propiedades diuréticas, natriouréticas, vasodilatorias⁴⁷¹ y también relacionados con la regulación del metabolismo energético.⁴⁷³ Además, se ha podido comprobar que tanto el ANP como el BNP son capaces de estimular la fosforilación oxidativa y la oxidación de ácidos grasos en miocitos de músculo esquelético en cultivo.⁴⁷⁴ Posteriormente, se ha demostrado el corazón puede sintetizar diferentes tipos de hormonas metabólicas^{110,115,127} que, junto con los péptidos natriuréticos, podrían actuar a nivel endocrino o autocrino/paracrino con posibles implicaciones en la regulación de diferentes procesos metabólicos a nivel sistémico.^{475,476}

Finalmente, numerosos trabajos han corroborado que los tejidos que componen el sistema cardiovascular producen y secretan adipokinas y hormonas metabólicas que están implicadas en diferentes procesos patológicos.^{99,477,478} A nivel vascular, las células que componen el músculo liso pueden expresar adipokinas como la resistina⁹⁹ y la adiponectina,⁴⁷⁹ y las células del endotelio pueden producir adipokinas como la apelina,⁴⁸⁰ la visfatina,⁴⁸¹ la leptina⁴⁷⁷ y la adiponectina.⁴⁸² A nivel del propio corazón, diversos estudios han demostrado que los cardiomiocitos no solo pueden sintetizar diferentes adipokinas como la adiponectina,⁴⁴¹ la visfatina,⁴⁸³ la resistina,⁴⁸⁴ grelina⁴⁵² o la leptina,⁴⁸⁵ sino que, a su vez dichas hormonas tienen efectos a nivel cardiomiocitario: la adiponectina contribuye al aumento de la captación de ácidos grasos y glucosa en cardiomiocitos,⁴⁴¹ reduce la inflamación⁸³ y mejora el daño inducido por isquemia/reperfusión.⁴⁸⁶ Por su parte, la grelina es capaz de inhibir la apoptosis inducida por la citarabina⁴⁵² en cardiomiocitos y la leptina induce apoptosis a nivel cardiomiocitario.⁴⁸⁷ Por lo tanto, el desarrollo de enfermedades cardiovasculares podría verse afectado no solo por el efecto a nivel sistémico de las adipokinas secretadas por el tejido adiposo, sino también por la producción de estas por el propio tejido cardiovascular.^{441,483-485,488}

5.- Chemerina, una nueva adipokina

5.1.- Descubrimiento de la chemerina: TIG-2/RARRES2

El gen que codifica la chemerina fue inicialmente identificado en estudios enfocados al análisis de la acción de nuevos fármacos retinoides en el tratamiento de las lesiones cutáneas producidas por la enfermedad inflamatoria de la psoriasis.⁴⁸⁹ Concretamente, Nagpal y colaboradores en el año 1997 constataron que dicho gen se expresaba en la piel sana mientras que, en la piel afectada por psoriasis su expresión génica se veía disminuida.⁴⁸⁹ Adicionalmente, su expresión se incrementaba y normalizaba tras ser tratadas las áreas afectadas con un fármaco retinoide de tercera generación denominado tazaroteno, por lo que se denominó al gen como TIG-2 (tazarotene-induced gene-2) o RARRES2 (retinoic acid receptor responder 2).⁴⁸⁹ Varios años más tarde, la chemerina fue redescubierta en estudios enfocados a la búsqueda de ligandos de receptores acoplados a proteínas G; en los que la chemerina fue aislada e identificada como el ligando natural de un receptor huérfano acoplado a proteínas G denominado ChemR23 en humanos y Dez en ratón.⁴⁹⁰ La importancia de identificar el ligando de dicho receptor radicaba en que, por una parte, ChemR23 estaba estructuralmente relacionado con otros receptores de quimioquinas y otras moléculas quimiotácticas pertenecientes a la familia de las citoquinas y, por otra parte, en experimentos *in vitro* se había podido observar que funcionaba como un correceptor de los virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) y de simios (VIS), lo que junto con su expresión tanto en macrófagos como en células dendríticas inmaduras podría otorgarle un papel crucial tanto en la regulación de la respuesta inmune temprana como en las inmunodeficiencias.^{490,491} La caracterización de la chemerina se llevó a cabo en diversos fluidos inflamatorios y hemofiltrados humanos así como en sangre, en los que actuaba como una proteína quimiotáctica a través del receptor ChemR23 con implicaciones a nivel inflamatorio.^{490,492,493} Investigaciones posteriores pusieron de manifiesto que poseía un papel determinante en la inducción de la quimiotaxis sobre células sensibles, por lo pasó a denominarse comúnmente como chemerin o chemerina/quemerina en castellano.^{490,494,495} Se pudo comprobar que la chemerina se expresaba de forma variable en un amplio rango de tejidos y órganos como el hígado, el pulmón o el tejido adiposo, en el que ejerce un papel fundamental en la diferenciación de los adipocitos y

en la captación de glucosa por estos, por lo que pasó a clasificarse también como una nueva adipocitoquina o adipokina.⁴⁹⁶

5.2.- Síntesis y estructura de la chemerina

La chemerina es el producto del gen RARRES2 o Tig2 y es sintetizada como un precursor denominado preprochermerina.⁴⁹⁰ Durante el proceso de biosíntesis los 20 primeros aminoácidos en el extremo amino-terminal o N-terminal, que constituyen el péptido señal, se escinden dando lugar a la prochermerina, la cual es secretada fuera de la célula.^{490,492} La estructura primaria de la chemerina está altamente conservada entre diferentes especies, especialmente el extremo carboxi-terminal o C-terminal y ciertos dominios en la región N-terminal.⁴⁹⁷ La chemerina humana comparte un 84%, 76%, 66% y 63% de la secuencia aminoacídica con cerdo, ternero, rata y ratón respectivamente⁴⁹⁷ (Figura 36).

	Péptido señal					
Humano	MRRLIPLAL	WLGAVGVG..VA	ELTEAQRRL	QVALEEFHKK	PPVQWAFQET	SVESAVDTPF 60
Cerdo	MWQLLLPLAL	WLGTMGLG..RA	ELTAAQLRGL	QVALEEFHKK	PPVQWAFRET	GVNSAMDTPF 60
Bovino	MWQLLLPLAL	GLGTMGLG..RA	ELTTAQRRL	QVALEEFHKK	PPVLWAFQVT	SVDNAADTLF 60
Rata	MKCLLISLAL	WLGTDIHGTEL	ELSETQRRL	QVALEEFHKK	PPVQWAFQEI	GVDSADDLFF 62
Ratón	MKCLLISLAL	WLGTVGTRGTEP	ELSETQRRL	QVALEEFHKK	PPVQLAFQEI	GVDRAEEVLF 62
Humano	PAGIFVRLEF	KLQQTSCRKR	DWKKPECKVR	PNGRKRKCLA	CIKLGSSEDKV	LGRIVHCPIE 120
Cerdo	PAGIFVRLEF	KLQQTSCRKR	DWKKAECKVK	PNGRKRKCLA	CIKLNSSEDKV	LGRMVHCPIE 120
Bovino	PAGIFVRLEF	KLQQTSCRKK	DWRKEDCKVK	PNGRKRKCLA	CIKLDSKQV	LGRMVHCPIQ 120
Rata	SAGTFVRLEF	KLQQTSLKK	DWKKPECTIK	PNGRKRKCLA	CIKLDPKGKV	LGRMVHCPII 122
Ratón	SAGTFVRLEF	KLQQTNCPPK	DWKKPECTIK	PNGRRRKCLA	CIKLDPKGKI	LGRIVHCPII 122
Humano	TQVIREAEEH	QETQCLRVQR	AGEDPHSHYF	PGQFAFSKAL	PRS	163
Cerdo	TQVQREPEER	QEAQCSRVER	AGEDPHSYFF	PGQFAFFKAL	PPS	163
Bovino	TQVQRELDAA	QDAQCSRVER	AGEDPHSYLL	PGQFAFIKAL	SP.	162
Rata	KQGPQQ...EP	QESQCSKIAQ	AGEDSRIYFF	PGQFAFSRAL	QSK	163
Ratón	KQGPQQ...DP	QELQCICKIAQ	AGEDPHGYFL	PGQFAFSRAL	RTK	162

Figura 36: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la chemerina entre diferentes especies que muestran el alto grado de conservación de determinadas regiones en el extremo N-terminal y C-terminal.⁴⁹⁷

La chemerina es una proteína que comparte poca homología en la secuencia aminoacídica primaria con otras proteínas conocidas. A pesar de ser una potente molécula quimiotáctica, su estructura terciaria es opuesta a la de las quimioquinas, en las cuales el extremo N-terminal es desordenado mientras que el C-terminal presenta

una conformación helicoidal.⁴⁹⁸ En su lugar, su estructura terciaria presenta un extremo N-terminal en hélice alfa, una parte en lámina beta y un extremo C-terminal desordenado, lo que refleja una mayor relación con otro tipo de proteínas extracelulares como los precursores de las catelicidinas (familia de péptidos con propiedades antimicrobianas, que se expresan en leucocitos y células epiteliales de mamíferos y otros vertebrados, y que desempeñan un papel importante en la respuesta inmune innata) y las cistatinas de tipo 2 (proteínas inhibidoras de cisteína proteasas)^{490,498} (Figura 37).

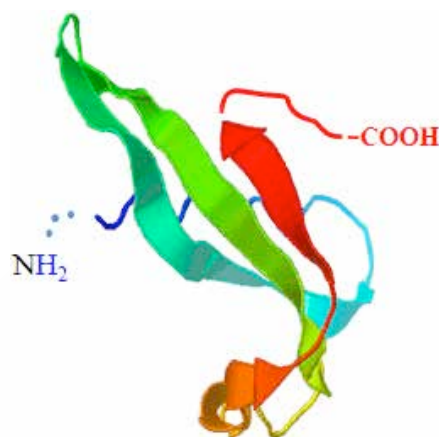


Figura 37: Predicción de la estructura tridimensional y plegamiento de la chemerina en su conformación terciaria, dicho plegamiento guarda una gran homología con el de las cistatinas.⁴⁹⁸

5.3.- Regulación de la chemerina

5.3.1.- Regulación transcripcional de la chemerina

Aunque el hígado y el tejido adiposo son los mayores órganos de producción de la chemerina, numerosos trabajos han demostrado que la chemerina se produce en muchos otros tejidos y órganos como la glándula adrenal, la placenta, el páncreas, los pulmones y la piel.^{490,493,499-501} Debido a su amplia expresión y asociación con determinados procesos inflamatorios y metabólicos, la expresión génica de la chemerina parece estar regulada o modulada tanto a nivel local como sistémico, afectando a procesos importantes como la inmunidad y el metabolismo.^{499,502,503} Dicha regulación a nivel génico de la chemerina se encuentra afectada por una amplia variedad de mediadores inflamatorios y metabólicos como pueden ser los agonistas de receptores nucleares (la vitamina D, los retinoides y los glucocorticoides), factores asociados a

procesos metabólicos (ácidos grasos, glucosa e insulina) y mediadores a nivel del sistema inmune (citoquinas y lipopolisacáridos (LPS))^{489,504–515} (Figura 38).

Tipo Celular	Receptores nucleares/ligandos de receptores nucleares	Factores metabólicos	Mediadores inmunomoduladores
Células epiteliales			
Queratinocitos humanos de piel	Tazaroteno(RARβ/γ)↑, SR 11217/SR 11237 (RXR)–, 1,25D3–		
Células intestinales fetales humanas	ATRA (RARβ)↑		TNFα↑
Enterocitos intestinales humanos			TNFα↑
Células epiteliales del túbulo renal humana:	1,25D3–, DEX–		TNFα↓, IFNγ↓, IL1β–, TGFβ–
Fibroblastos			
Fibroblastos humanos de la piel	1,25D3↑		IFNγ–, IFNα–, TNFα–, CXCL8–, TGFβ–,
Sinoviocitos humanos			TNFα↑, IFNγ↑, IL1β–, IL6–, TGFβ–
Condrocitos			
Condrocitos humanos inmortalizados T/C-28a2	IL1β↓	Adiponectina↓, Leptina↓	LPS↓
Línea celular condrogénica de ratón ATDC-5	DEX↑	Adiponectina–, Leptina –	IL1β↑, LPS–
Células ST2 del estroma de ratón	1,25D3↑, DEX↑		
Adipocitos			
Adipocitos humanos/adipocitos de explante	PPARγ (troglitazona) (mRNA)– (proteína)↓, esteroides adrenales y gonadales –	Adiponectina–, Insulina↑, Ácidos grasos libres (SREBP2)↑, Metformina↓	TNFα↑
Línea celular adipogénica 3T3-L1 de ratón	PPARγ (troglitazona) ↑		TNFα↑, IL1β↑
Células madre mesenquimales de médula ósea de ratón	PPARγ (rosiglitazona) ↑		
Hepatocitos			
Línea celular HepG2 de hepatoma humano	FXR (GW4064)↑		
Hepatocitos de ratón	FXR (GW4064)↑		TNFα–

Figura 38: Regulación de la expresión génica de la chemerina por factores inflamatorios y metabólicos en diferentes tipos celulares. ↑ aumento, ↓ descenso, – sin efecto. Abreviaturas: 1,25D3, 1,25 dihidroxivitamina D3; ATRA, ácido transretinoico; DEX, dexametasona; FXR, receptor X farnesoide; GW4064, ligando sintético de FXR; PPARγ, receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma; RARβ, receptor de ácido retinoico beta; RARγ, receptor de ácido retinoico gamma; SR 11217/SR 11237, ligandos sintéticos de receptores de ácido retinoico (RXR),⁵⁰³

- Regulación de la expresión de la chemerina por receptores nucleares

Los receptores nucleares son un tipo de factores de transcripción con la capacidad para activar o reprimir la transcripción de genes en función del ligando que se una a ellos.⁵¹⁶ Aunque este tipo de receptores fueron identificados inicialmente como factores de transcripción que regulaban la expresión génica de hormonas lipofílicas, como las hormonas tiroideas o los glucocorticoides, ahora se conoce que también actúan frente a

otras moléculas como el receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ (PPAR γ), receptores de ácido retinoico (RXRs) o el receptor de vitamina D3 (VDR).^{516,517}

El Tazaroteno, fármaco análogo del ácido retinoico usado para el tratamiento de enfermedades de hiperproliferación de la piel como la psoriasis, fue el primer factor identificado con la capacidad de inducir la síntesis de la chemerina, cuya expresión se encontraba reducida en esta afección.⁴⁸⁹ A día de hoy se conoce la existencia de más factores con la capacidad de inducir la expresión de la chemerina: el calcitriol, la forma hormonalmente activa de la vitamina D, así como la dexametasona tienen la capacidad de afectar la expresión del ARNm del gen de la chemerina, TIG2, en la línea celular ST2 durante su diferenciación a osteoclastos.⁵⁰⁵ Sin embargo, tanto el calcitriol como la dexametasona no tienen la capacidad de modificar la expresión de la chemerina en células epiteliales del túbulo renal, lo cual sugiere una regulación del gen TIG2 específica y dependiente del tipo celular.⁵⁰⁸ La chemerina ha sido también identificada como una diana para el receptor nuclear PPAR γ , que es un regulador fundamental en el metabolismo de lípidos y glucosa, y desempeña un papel crítico en el proceso de la adipogénesis.^{512,518} Otro receptor nuclear, el receptor X farnesoide (FXR) parece estar también implicado en la regulación de la expresión génica de la chemerina en hígado.⁵¹⁹ Los ácidos biliares, involucrados en la absorción de los ácidos grasos y las vitaminas liposolubles, son ligandos naturales del receptor X farnesoide, que se expresa a elevados niveles en el hígado y en el intestino donde controla el metabolismo de los lípidos y la glucosa.⁵²⁰ En un estudio reciente, Deng y colaboradores han demostrado en 2013 que el ligando sintético GW4064 del receptor FXR es capaz de inducir un incremento dependiente de la dosis en la expresión del gen de chemerina en la línea celular Hep G2, derivada de células hepáticas tumorales humanas.⁵¹⁹ Además, en el mismo trabajo se han obtenido los mismos resultados en hepatocitos de ratón, así como la pérdida del efecto en hepatocitos de ratones deficientes del receptor FXR, lo que sugiere una relación directa entre la chemerina y el receptor nuclear FXR a nivel hepático.⁵¹⁹

Todos estos datos apoyan la implicación de diferentes receptores nucleares en la regulación de la expresión de la chemerina a nivel génico. Este impacto en los niveles de expresión génica de la chemerina podría estar explicado por una modulación en la actividad del promotor del gen de la chemerina: Análisis computacionales del promotor han identificado sitios de unión para el receptor nuclear RAR- β (Receptor de Ácido Retinoico beta), lo cual podría explicar la respuesta del gen de la chemerina frente a

derivados del ácido retinoico como el Tazaroteno en piel humana⁴⁸⁹ o el ATRA en células epiteliales de intestino fetal humano.⁵⁰⁶ Además, diferentes estudios han identificado adicionalmente en el promotor del gen de la chemerina de ratón elementos de respuesta funcionales para los receptores nucleares PPAR γ , en el tejido adiposo blanco⁵¹² y para FXR, en hepatocitos⁵¹⁹ (Figura 39).

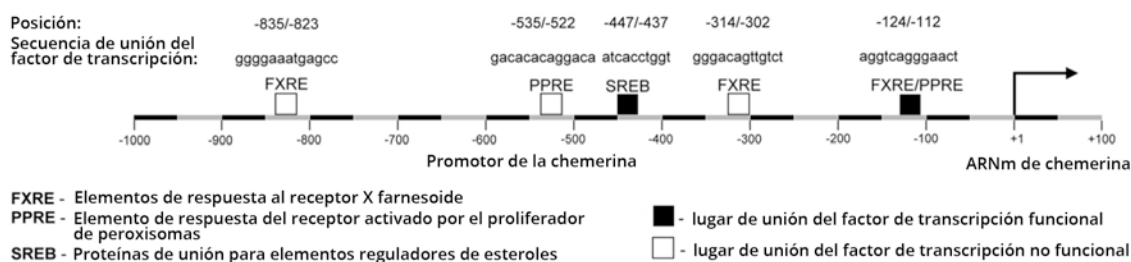


Figura 39: Esquema del promotor del gen de la chemerina en ratón mostrando la localización y secuencias de los sitios de unión de factores de transcripción.⁵⁰³

- Regulación de la expresión de la chemerina por factores metabólicos

Diversos estudios han demostrado que la expresión de la chemerina también puede estar influenciada por otros factores implicados en la regulación metabólica: Bauer y colaboradores en 2011 pusieron de manifiesto que, en presencia de ácidos grasos libres, la síntesis de chemerina se veía incrementada en la línea celular de ratón 3T3-L1 durante su diferenciación a adipocitos;⁵¹⁰ además, la elevación de los niveles de expresión de la chemerina en las células 3T3-L1 coincidía con un aumento de la activación de la proteína 2 de unión al elemento regulador de esterol (SREBP2), un factor de transcripción que controla la homeostasis del colesterol mediante la unión a regiones promotoras de genes necesarios para la síntesis del mismo.^{510,521} Un análisis posterior del promotor de la chemerina identificó una región consenso como lugar de unión para elementos reguladores de esteroides (SREB).⁵¹⁰

Adicionalmente, diferentes trabajos han demostrado que la expresión de chemerina parece estar afectada también por la insulina y la glucosa. En individuos sanos, los niveles en plasma de chemerina se encontraron significativamente más elevados en

aquellos a los que se les había suministrado previamente insulina y en explantes de tejido adiposo humano la insulina inducía la expresión de la chemerina.⁵⁰⁷

Por otra parte, la metformina, un antidiabético que suprime la producción hepática de glucosa y mejora la captación periférica de la misma a través de la inducción de la translocación del receptor de glucosa GLUT4, puede suprimir la síntesis y secreción de la chemerina en explantes de tejido adiposo, así como reducir los niveles de chemerina circulante en pacientes.^{507,522}

- Regulación de la expresión de la chemerina por citoquinas

La expresión de la chemerina parece estar modulada también por otros mediadores tan importantes como las citoquinas. Concretamente, el TNF- α es capaz de inducir *in vitro* la expresión del ARNm y la proteína en la línea celular 3T3-L1 de adipocitos y, a su vez, el tratamiento *in vivo* con TNF- α es capaz de producir un incremento significativo en los niveles plasmáticos en ratón.⁵¹⁴ Sin embargo, el papel que desempeña el TNF- α en el control de los niveles de chemerina parece ser ambiguo, puesto que otros estudios han demostrado que en células epiteliales humanas del túbulo proximal renal el TNF- α es capaz de suprimir la transcripción de la chemerina y la secreción de la proteína.⁵⁰⁸ A su vez, el TNF- α muestra capacidad de inducir un incremento en los niveles de la chemerina activa, lo que provocaba la migración de células dendríticas del sistema inmune, por lo que la chemerina activa podría desempeñar un papel en el reclutamiento de dichas células a nivel renal.⁵⁰⁸ Por lo tanto, el TNF- α no solo parece desempeñar un papel en la regulación de la expresión génica de la chemerina, sino que además tiene la capacidad de regular su procesamiento proteolítico para convertirla en una forma activa a nivel quimiotáctico.⁵⁰⁸

La Interleuquina-1 β (IL-1 β) es otra citoquina que ha demostrado la capacidad de modificar los niveles de expresión de la chemerina. En experimentos *in vitro* llevados a cabo en la línea celular de preadipocitos 3T3-L1, una vez diferenciados en adipocitos, se ha podido comprobar que el tratamiento con IL-1 β es capaz de producir un aumento significativo en los niveles de ARNm y proteína de la chemerina dependiente de la dosis y el tiempo, lo que unido al hecho de que la IL-1 β está implicada en la resistencia a la insulina en adipocitos, sugiere una posible participación de la chemerina en la

modulación de los efectos de la IL-1 β en el metabolismo y la sensibilidad a la insulina en estas células.⁵¹³

Finalmente, el Interferón gamma (IFN- γ) también parece estar implicado en la regulación de la expresión de la chemerina: en estudios llevados a cabo en sinoviocitos tipo fibroblastos procedentes de pacientes con artritis reumatoide, se ha podido comprobar que el IFN- γ tiene la capacidad de inducir un aumento dosis dependiente en los niveles de expresión de la chemerina.⁵¹⁵

5.3.2.- Regulación postranscripcional en la actividad de la chemerina

- Secreción de la chemerina

El mecanismo molecular subyacente en la secreción de la chemerina no ha sido bien caracterizado todavía, aunque probablemente la proteína siga vías de secreción celular convencionales dado el alto nivel de conservación del péptido señal en la región N-terminal.⁴⁹⁰ La chemerina es sintetizada como una proteína de 163 aminoácidos que, después de la escisión de los 20 aminoácidos hidrofóbicos que constituyen el péptido señal, es secretada como prochemerina, un precursor que en humanos consta de 143 aminoácidos con una mínima actividad quimiotáctica.⁴⁹⁷ Numerosos trabajos han demostrado que la prochemerina requiere de un procesamiento proteolítico específico a nivel extracelular necesario para su activación, consistente en la escisión de un determinado número de aminoácidos en el extremo C-terminal.⁴⁹⁰

- Expresión de la chemerina

Aunque, inicialmente la chemerina fue identificada en la piel, se ha podido comprobar que se encuentra como prochemerina de forma ubicua a nivel sistémico, puesto que se ha podido aislar en hemofiltrados, plasma y suero.⁵²³ Además, su expresión se ha confirmado en una amplia variedad de células y tejidos como el tejido adiposo, donde parece jugar un papel determinante en el metabolismo de los adipocitos.⁴⁹⁹ La

chemerina también es secretada por el hígado, el bazo, los nodos linfáticos, el epitelio, el páncreas, los pulmones, las plaquetas y en especial en las células del sistema inmune, donde parece desarrollar un importante papel a nivel inmunitario junto con su receptor⁴⁹⁹ (Figura 40).

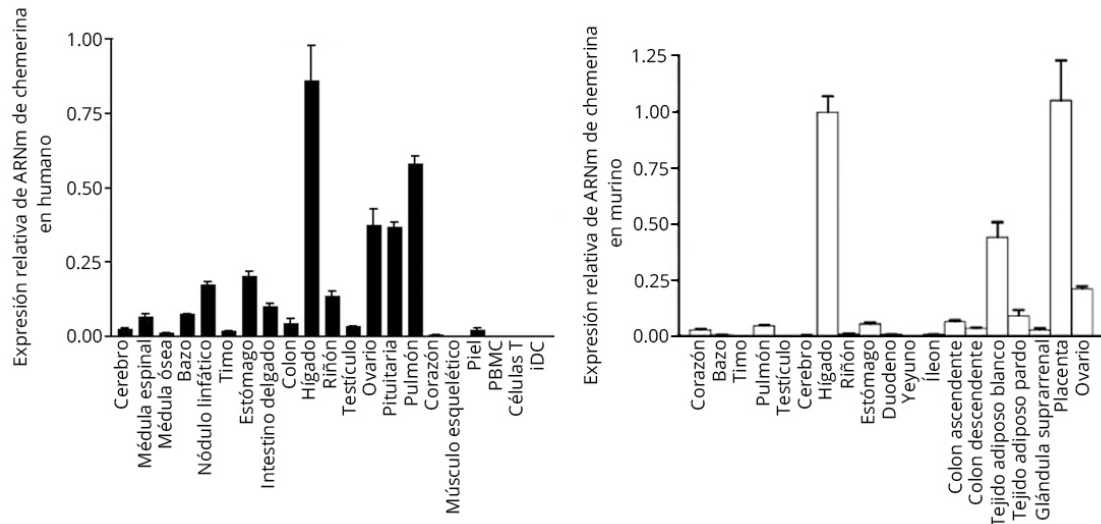


Figura 40: Expresión del ARNm de la chemerina en tejidos y células humanos (izquierda) y en ratón (derecha) en unidades arbitrarias.^{490,499}

- Procesamiento proteolítico

Como se ha mencionado anteriormente, la chemerina está regulada a nivel transcripcional, sin embargo, el procesamiento postranscripcional del extremo C-terminal de la prochemerina juega un papel crucial, puesto que, va a determinar el grado de bioactividad de la chemerina madura.⁴⁹⁴

En humanos, la forma chem163S, que constituye la prochemerina de 143 aminoácidos después de la escisión de los del péptido señal y su secreción, se presenta de forma abundante en la circulación aunque es funcionalmente inerte.⁴⁹⁶ Esta forma de la chemerina contiene un dominio con un plegamiento similar a las cistatinas y una región C-terminal lábil que puede ser procesada por una variedad de proteasas que operan bajo distintas condiciones fisiológicas o fisiopatológicas.⁴⁹⁶ Por tanto, la escisión proteolítica del extremo C-terminal en la forma chem163S libera un péptido terminal inhibitorio y deja como resultado la chemerina madura que posee actividad quimiotáctica.^{494,524}

Diferentes estudios han podido aislar péptidos, variantes de la chemerina chem163S, con distintos procesamiento proteolíticos procedentes de muestras de fluidos humanos: la chemerina purificada a partir de hemofiltrados humanos carece de los nueve últimos aminoácidos de la región C-terminal (chem154F), mientras que la chemerina presente en suero adolece únicamente de los ocho últimos aminoácidos (chem155S) y la detectada en fluidos ascíticos en pacientes con cáncer de ovario carece de los últimos seis aminoácidos (chem157S) en comparación con su precursor.^{490,494,498} Además, se ha detectado una variante de la chemerina que carece de los últimos 5 aminoácidos (chem158K), como la forma predominante tanto en el líquido sinovial como en el cefalorraquídeo en pacientes con artritis reumatoide y glioblastoma, respectivamente.⁵²⁵

Entre todas las variantes conocidas de la chemerina, la chem157S aparece como la isoforma más efectiva a la hora de desencadenar una respuesta quimiotáctica en diferentes células del sistema inmune y, aunque no se ha demostrado todavía *in vivo*, la isoforma humana chem156F posee también actividad biológica en células murinas en cultivo.^{526,527} Mediante el uso de la técnica de ELISA con anticuerpos capaces de detectar tanto la chemerina sin procesar chem163S como las isoformas chem158K y chem157S, se ha descubierto que la mayoría de la chemerina es proteolíticamente procesada en ambientes inflamatorios.⁵²⁵ Mientras que en condiciones normales el plasma humano contiene las isoformas procesadas chem158K y chem157S en un porcentaje conjunto inferior al 20%, en muestras de líquido cefalorraquídeo en estados de inflamación y de líquido sinovial en artritis reumatoide, la fracción de la chemerina procesada ronda el 50% y 75% respectivamente.⁵²⁵ Estos resultados parecen indicar que la chemerina experimenta un extenso procesamiento proteolítico *in vivo*, particularmente durante procesos inflamatorios (Figura 41).

Aunque algunos trabajos han puesto de manifiesto que ciertas células están equipadas con los mecanismos proteolíticos necesarios para procesar la chemerina a sus formas activas, lo que sugiere una regulación de la actividad de la chemerina a nivel local,⁵²⁸ también se ha podido comprobar que la chemerina sirve como sustrato de proteasas presentes a nivel sistémico en el plasma.⁴⁹⁴

El procesamiento proteolítico de la chemerina ha sido analizado *in vitro* mediante la incubación de chemerina recombinante o purificada de fuentes naturales con proteasas

específicas.⁵²⁹ A través de este tipo de enfoque se ha podido generar chemerina funcional a través del uso de enzimas serina-proteasas y cisteína-proteasas, que se caracterizan por el uso de serina o cisteína en sus centros catalíticos, respectivamente.⁵²⁹ Estas enzimas incluyen a serina-proteasas de la coagulación, la fibrinólisis o implicadas en la inflamación, tales como: la elastasa y catepsina G secretadas por neutrófilos, la triptasa producida por mastocitos, los factores de coagulación presentes en plasma XIIa, VIIa y la plasmina,^{494,524} además de cisteína-proteasas como las catepsinas K y L.⁵²⁹ Al margen de las proteasas endógenas que regulan la bioactividad de la chemerina, tanto en condiciones de homeostasis como patológicas, la actividad de la chemerina puede ser controlada también por proteasas secretadas por patógenos: la cisteína-proteasa Staphopain B, derivada de *Staphylococcus aureus*, es un potente activador enzimático de la chemerina que genera la variante chem157S en humanos⁵³⁰ (Figura 41).

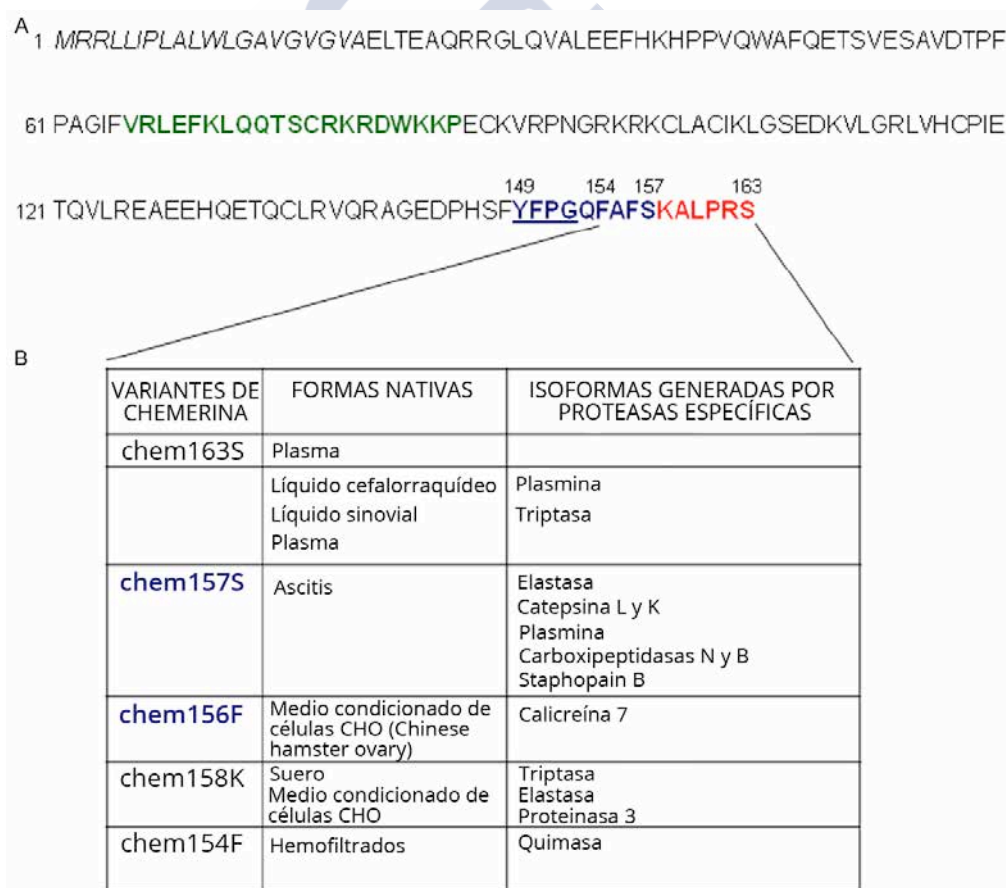


Figura 41: Regiones funcionales en la secuencia de la chemerina. A: En la secuencia primaria de aminoácidos de la chemerina humana se muestra en verde los péptidos que muestran actividad antibacteriana y que han sido evaluados a nivel funcional. En rojo se muestra la región C-terminal inhibitoria y en azul aparecen los péptidos resultantes del procesamiento proteolítico y que poseen actividad quimiotáctica. B: Generación proteolítica de las distintas isoformas de la chemerina.⁵⁰³

Como se ha mencionado previamente, la chemerina puede ser activada proteolíticamente de forma directa por una amplia variedad de proteasas pero, adicionalmente, se ha podido comprobar que la chemerina puede ser activada también de forma secuencial. Du y colaboradores en el año 2009 demostraron que las carboxipeptidasas plasmáticas de tipo N y B, las cuales hidrolizan aminoácidos presentes en el extremo C-terminal de proteínas y péptidos, pueden actuar en sincronía con otra proteasa como la plasmina: la isoforma de la chemerina chem158K es producida previamente por la acción de la plasmina para, a continuación, ser procesada por las carboxipeptidasas N y B en la generación de una isoforma más activa de la chemerina (chem157S).⁵³¹

De la misma forma que las proteasas son necesarias para producir las distintas isoformas activas de la chemerina, también pueden inactivarlas o degradarlas y por tanto limitar la actividad de la chemerina y sus efectos. Estos mecanismos de regulación en la actividad de la chemerina se han podido observar, por ejemplo, en los neutrófilos reclutados por tejidos, donde estas células del sistema inmune secretan dos proteasas, la elastasa y la catepsina G, con capacidad para activar la prochemerina (chem163S).^{524,532} Sin embargo, también son capaces de secretar la proteinasa 3, que procesa la prochemerina y la convierte en una forma sin actividad quimiotáctica, la chem155A, que difiere de la forma más activa (chem157S) en solo dos aminoácidos.⁵³²

El procesamiento proteolítico de la prochemerina (chem163S) no es la única vía de interacción de las proteasas con la chemerina, estas pueden también actuar de modo selectivo sobre las diferentes variantes procesadas de la chemerina. Por ejemplo, la quimasa secretada por los mastocitos no usa la prochemerina como sustrato, sino que actúa sobre las variantes chem157S y chem156F eliminando su actividad mediante la conversión de estas isoformas a la isoforma inactiva chem154F⁵³² (Figura 42). Sin embargo, se ha podido comprobar que el procesamiento *in vitro* de la prochemerina de ratón por la catepsina S y las calpaínas origina la variante chem154A que, al contrario que la humana, posee actividad antiinflamatoria.⁵³³ Debido al aislamiento, a partir de fluidos y tejidos, de las diferentes variantes de la chemerina en el extremo C-terminal, el estudio de la regulación de la chemerina a nivel postraducciona se ha enfocado en la acción de las diferentes proteasas en el extremo carboxi-terminal. Sin embargo, Wittamer y colaboradores en 2004 demostraron mediante ensayos *in vitro* de unión de

ligando a receptor que usando péptidos de la región C-terminal de diferente longitud en aminoácidos algunos de ellos mantenían la capacidad de unión al receptor.⁵²⁷ En especial, el péptido correspondiente a los 9 últimos aminoácidos de la forma activa de la chemerina chem157S (¹⁴⁹YFOGQFAFS¹⁵⁷) retiene una parte de la actividad de la forma completa de la isoforma chem157S.⁵²⁷ Estos resultados sugieren que las isoformas completas de la chemerina poseen mayor actividad que los péptidos derivados de la región C-terminal y que, por lo tanto, la región N-terminal de la prochemerina puede contribuir en la actividad quimiotáctica de la misma. Además, se ha podido comprobar en el medio de cultivo de adipocitos 3T3-L1 tratados con TNF- α , que las concentraciones de chemerina activa se encontraban significativamente más elevadas cuando se inhibían farmacológicamente las aminopeptidasas (las enzimas que catalizan la proteólisis de aminoácidos en la región N-terminal de proteína o péptidos), lo que sugiere que las aminopeptidasas podrían tener la capacidad de romper e inactivar la chemerina a nivel del extremo N-terminal.⁵²⁸

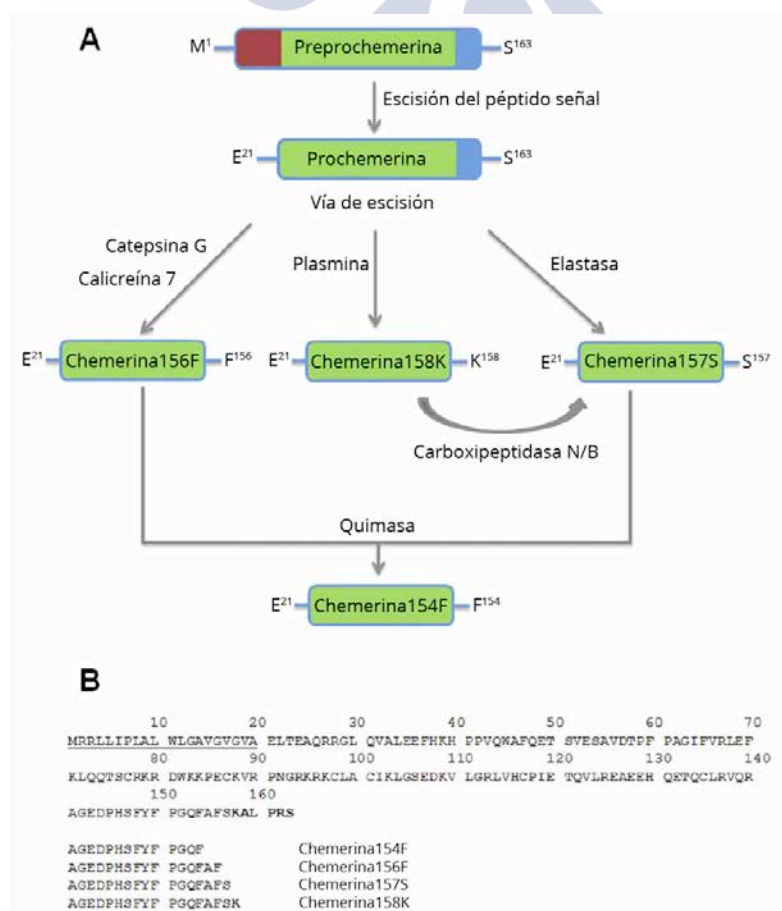


Figura 42: A: Procesamiento de la chemerina por diferentes proteasas. B: Secuencia de aminoácidos de la chemerina. El péptido señal (subrayado) es retirado antes de su secreción. El procesamiento de la zona C-terminal tiene como resultado la isoforma más activa chem157S así como otras variantes.⁵³⁴

6.- Receptores de la chemerina

Existen tres receptores conocidos para la chemerina: CMKLR1, GPR1 y CCRL2, que se une a los tres con una similar afinidad, aunque con resultados a nivel funcional sustancialmente diferentes.^{535,536}

6.1.- CMKLR1

El gen CMKLR1 (Chemokine like receptor 1) fue clonado por primera vez en 1996 y se pudo comprobar que codificaba una proteína que poseía un alto grado de homología, tanto en su secuencia como a nivel estructural, con los receptores de las quimioquinas, caracterizados por contener siete dominios transmembrana y estar acoplados a proteínas G.⁵³⁷ Al desconocerse el ligando y función de CMKLR1, este fue clasificado como un receptor huérfano acoplado a proteínas G cuyo ARN mensajero se expresaba en tejidos asociados con funciones hematopoyéticas e inmunes (bazo, timo, apéndice, nódulos linfáticos, médula ósea e hígado fetal).⁵³⁷ Posteriormente, Samson y colaboradores en 1998 redescubrieron este receptor bajo el nombre de ChemR23, cuya expresión se extendía a células concretas del sistema inmune como las células dendríticas, los macrófagos o los linfocitos, y aunque no se pudo hallar el ligando natural de este receptor huérfano, sí se pudo determinar *in vitro* su papel determinante como correceptor necesario para la fusión de determinados virus de inmunodeficiencia a sus células diana.⁴⁹¹

El gen ortólogo de CMKLR1 en ratón se denomina Dez y comparte más del 80% de homología con el humano. Se encontró una alta expresión en las glándulas paratiroides en ratones adultos, en tejido osteogénico y cartilaginoso y, por tanto, con posibles implicaciones en el metabolismo óseo. En rata también se pudo identificar el receptor CMKLR1, aunque no sus posibles ligandos, pero su alta expresión en tejidos vinculados al sistema inmune sugería una importante función en la regulación de la inflamación.⁵³⁸ Aunque inicialmente al receptor CMKLR1 fue localizado en células y tejidos relacionados con el sistema inmune e inflamación, posteriormente ha podido ser localizada su expresión en una amplia variedad de tejidos y células en humanos y murinos, lo que sugiere una posible implicación en una amplia variedad de procesos a nivel sistémico^{490,499} (Figura 43).

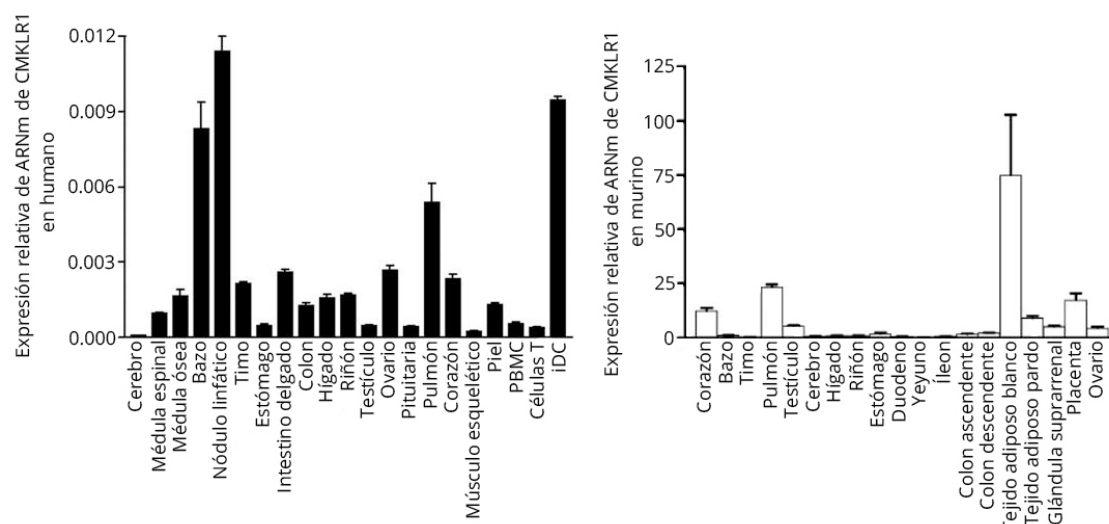


Figura 43: Expresión del ARNm del receptor CMKLR1 en tejidos y células humanas (izquierda) y en murinos (derecha), en unidades arbitrarias.^{490,499}

Finalmente, se identificó a la chemerina como el ligando natural para el receptor CMKLR1 gracias a los trabajos, casi simultáneos, de Meder⁴⁹² y Wittamer,⁴⁹⁰ en los que se expuso al receptor CMKLR1 a más de 200 moléculas con actividad biológica (entre ellas un gran número de quimioquinas) y a distintas fracciones de fluidos inflamatorios ascíticos y hemofiltrados, donde pudo ser confirmada la unión de la chemerina al receptor CMKLR1.^{490,492} Se pudo determinar que la unión de la chemerina al receptor produce una activación de dicho receptor a partir de proteínas G heterodiméricas (G_i) y desencadena la liberación de calcio intracelular, la inhibición de la acumulación de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y la fosforilación de las MAP quinasas p42-p44.⁴⁹⁰ Inicialmente, el estudio de la chemerina y CMKLR1 se enfocó principalmente hacia sus propiedades quimiotácticas y existe un amplio número de estudios llevados a cabo por diferentes laboratorios que demuestran la capacidad de movilizar mediante quimiotaxis a los leucocitos.⁵³⁹ Además, CMKLR1 es responsable directo de la migración de células dendríticas hacia órganos linfoides y piel inflamada.⁴⁹⁵

Estudios posteriores, han podido comprobar que CMKLR1 no es un receptor exclusivo de la chemerina, sino que existe un ligando adicional con la capacidad de unión a este receptor: la Resolvina E1 (RvE1), un potente mediador antiinflamatorio derivado del ácido eicosapentaenoico perteneciente a la familia de ácidos grasos omega 3.⁵⁴⁰ La activación de CMKLR1 a través de sus ligandos, tanto las distintas isoformas de la chemerina como la RvE1, se desencadena por la capacidad de estas moléculas de unirse

al receptor de forma más o menos selectiva y cambiar su conformación.⁵⁴¹ Este cambio en la conformación del receptor puede ser total, parcial o incluso nulo, lo que conlleva diferentes efectos a nivel biológico mediante la activación de diferentes vías de señalización posteriores a la unión de los respectivos ligandos a CMKLR1⁵⁴¹ (Figura 44).

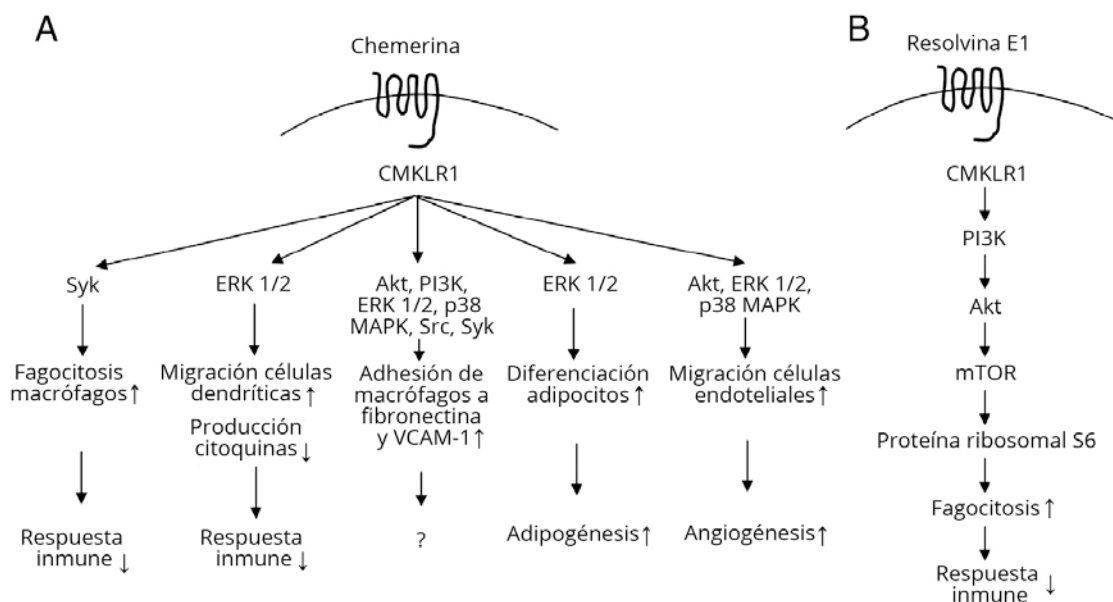


Figura 44: Efectos funcionales derivados de la activación del receptor CMKLR1. A: La interacción de la chemerina o sus diferentes isoformas con el receptor CMKLR1 presente en macrófagos, células dendríticas, adipocitos o células endoteliales induce la activación de moléculas de señalización intracelular como la tirosina quinasa Syk, ERK1/2, p38 MAP quinasa, Akt o PI3K, lo que conduce a una reducción en la respuesta inmune y mejora la adipogénesis y angiogénesis. B: De forma similar a la chemerina, la Resolvin E1 disminuye la producción de citoquinas en macrófagos a través de una reducción en la actividad de ERK1/2 y NF-κB.⁵⁴¹

6.2.- GPR1

En el año 2008 el equipo de Barnea y colaboradores buscaban la identificación de un ligando para un receptor huérfano acoplado a proteínas G conocido como GPR1.⁵³⁵ Debido al alto grado de conservación de GPR1 en mamíferos y a la gran similitud entre su secuencia y la del receptor CMKLR1, se intentó comprobar si este nuevo receptor, con una función a nivel biológico todavía desconocida, era capaz de generar una respuesta frente a la chemerina.⁵³⁵ Los resultados de los experimentos *in vitro* demostraron, en efecto, que la chemerina podía activar al receptor GPR1 incluso a dosis más bajas y con más afinidad con respecto al receptor CMKLR1.⁵³⁵ Estos resultados ponían de manifiesto la existencia de un segundo receptor de la chemerina

cuya unión al ligando era capaz de desencadenar una elevación intracelular de calcio al igual que CMKLR1, aunque menos efectiva y con un efecto totalmente desconocido.⁵³⁵ Estudios posteriores han demostrado que la expresión del ARNm de Gpr1 en ratón muestra un patrón de expresión totalmente diferente al de CMKLR1: GPR1 se produce principalmente en músculo esquelético y en la fracción vascular estromal del tejido adiposo blanco, sin evidencias de su presencia en células endoteliales, linfocitos o leucocitos.⁵⁴² Además, se ha demostrado que ratones obesos en los que se ha abolido la expresión del gen GPR1 desarrollan una intolerancia más severa a la glucosa con respecto a ratones que expresan de forma natural el gen GPR1, a pesar de no mostrar diferencias en el peso corporal, el grado de adiposidad o el gasto energético.⁵⁴²

Estos estudios han puesto de manifiesto que GPR1 es un receptor de la chemerina totalmente funcional y con posibles implicaciones en la homeostasis de la glucosa en estados de obesidad. Sin embargo, el receptor GPR1 en humanos solo comparte el 47% de la secuencia con la de ratón, y su función y expresión en humanos todavía no ha sido estudiada, desconociéndose sus efectos a nivel funcional, por lo que podrían variar considerablemente con respecto a los descritos en ratón previamente.⁵⁴²

6.3.- CCRL2

El último receptor de la chemerina fue descubierto en 1998 en humanos como un receptor huérfano acoplado a proteínas G, bajo el nombre de HCR (human chemokine receptor) y posteriormente renombrado como CCRL2 (C-C chemokine receptor-like 2) por su cierta homología filogenética con la subfamilia de receptores de quimioquinas del grupo CC o β -quimioquinas.⁵⁴³ Su redescubrimiento y vinculación con la chemerina no se produciría hasta 2008, cuando el equipo de Zabel investigaba este receptor y sus mecanismos de activación.⁵³⁶ Estos autores demostraron que el receptor CCRL2 de ratón se expresaba de forma constitutiva en mastocitos, no era capaz de internalizarse después unirse a la chemerina y, por lo tanto, no existía una transducción de señales en el interior de la célula.⁵³⁶ Estudios posteriores han podido demostrar que el receptor CCRL2 también se expresa en células endoteliales vasculares y en una amplia variedad de células del sistema inmune como leucocitos, macrófagos y células dendríticas^{544,545}

Tanto la proteína CCRL2 de humano como de ratón carecen de la secuencia consenso “DRYLAIV”, de vital importancia por su función en el acoplamiento a las proteínas G heterodiméricas, lo que confirmaría las hipótesis previas que no consideran a CCRL2 como un receptor quimiotáctico clásico sino que, al contrario de lo que ocurre con CMKLR1, CCRL2 no tiene capacidad quimiotáctica ni de provocar la movilización intracelular de calcio tras la unión de la chemerina.⁵³⁶ Sin embargo, las células que presentan el receptor CCRL2 tienen la capacidad de secuestrar chemerina del medio.⁵³⁶ La chemerina se une a CCRL2 por el extremo N-terminal, en una orientación que permite que el extremo C-terminal, crítico para la señalización celular, siga siendo accesible en lugar de permanecer enterrado en el bolsillo del receptor, como sucede en el caso de la unión de la chemerina a CMKLR1.^{536,544} Basándose en estas observaciones, varios autores han hipotetizado que el receptor CCRL2 serviría para regular la concentración de chemerina a nivel local: de esta forma, la chemerina quedaría unida a CCRL2 y podría ser procesada proteolíticamente para convertirse en la forma activa y ser presentada a las células adyacentes con receptores CMKLR1, que serían las encargadas de desencadenar la señalización intracelular.^{536,544,546}

Actualmente, estos tres receptores son los únicos conocidos para la chemerina. El receptor CMKLR1 ha sido el más estudiado, no solo por ser el primer receptor conocido de la chemerina, sino también por el hecho de que su expresión sea abundante en diferentes tipos celulares y tejidos y por su implicación junto con la chemerina en procesos tanto fisiológicos como fisiopatológicos. Su activación y ruta de señalización interna, aunque en vías de dilucidarse por completo, son las más estudiadas de los tres receptores, aunque cada vez existen más trabajos que tratan de profundizar en la función de GPR1 y CCRL2⁵⁴⁷ (Figura 45).

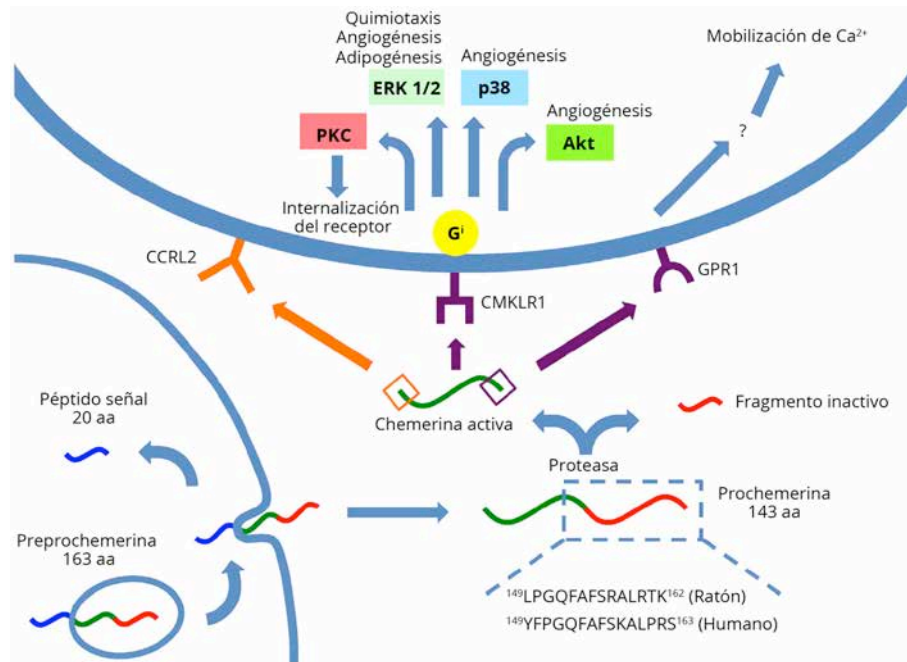


Figura 45: Procesamiento y vías de actuación de la chemerina a través de sus receptores. Cuando la preprochermina es secretada el péptido señal se escinde (azul) para convertirse en prochermina. A continuación, la prochermina es procesada por diferentes proteasas que la convierten en la chemerina activa (verde) y el fragmento del extremo C-terminal sin actividad (rojo). Es entonces cuando la chemerina puede o bien unirse por el extremo N-terminal (naranja) al receptor CCRL2 o a través del extremo C-terminal (morado) a los receptores CMKLR1 o GPR1 y ejercer su acción.⁵⁴⁸

7.- Funciones conocidas de la chemerina a nivel fisiológico

La chemerina y sus receptores se pueden localizar en todo tipo de células y tejidos a lo largo del cuerpo humano y de otros animales, y todos los estudios sugieren que la chemerina tiene un papel multifuncional como quimioquina, adipokina y posiblemente como un factor de crecimiento.⁵³⁴ Existe un creciente número de trabajos sobre las implicaciones de la chemerina en la fisiopatología de diversos desórdenes metabólicos y no metabólicos.⁵⁴⁸ La comprensión del mecanismo de acción de la chemerina es altamente complejo debido a las varias isoformas, a su expresión localizada y a sus procesos de activación. En la actualidad, el papel de la chemerina no ha sido completamente dilucidado, y la heterogeneidad de sus funciones y su implicación en múltiples sistemas a nivel corporal hace que el estudio del papel de esta proteína siga siendo un desafío en áreas como el metabolismo, la endocrinología y, en general, la biomedicina.

7.1.- La chemerina como agente quimiotáctico

Cuando se descubrió la chemerina, se encontró que su expresión estaba presente en la piel normal pero se reducía considerablemente en las lesiones producidas por psoriasis, lo que aparentemente parecía indicar que la chemerina estaba involucrada en el mantenimiento fisiológico de la piel en humanos.⁴⁸⁹ Desde entonces han surgido múltiples estudios que parecen poner en tela de juicio esta hipótesis inicial: una vez descubierto el mecanismo de activación de la chemerina, mediante la escisión proteolítica extracelular (llevado a cabo por proteasas de la coagulación, fibrinólisis, la elastasa de neutrófilos y la triptasa de los mastocitos entre otras), todas las evidencias apuntaban hacia una activación de la chemerina como resultado de procesos inflamatorios, y no como una causa de estados fisiológicos normales.⁴⁹⁴

La piel es la primera línea de defensa frente a la infección y la invasión por patógenos: los queratinocitos presentes en la epidermis secretan una variedad de péptidos con acción antimicrobiana como la chemerina, que funcionan a modo de escudo químico a nivel epitelial contra estos.⁵⁴⁹ Estos péptidos con acción antimicrobiana están dirigidos a una amplia gama de microorganismos tan divergentes como hongos o bacterias, y poseen la capacidad de matar o inhibir el crecimiento celular.⁵⁴⁹ Algunos de estos péptidos, incluyendo la chemerina, poseen un segundo papel en la defensa del huésped frente a los patógenos como moléculas quimiotácticas que atraen a células del sistema inmune como los leucocitos.⁵⁰⁰ La chemerina, además, puede atraer a otras células del sistema inmune innato que, a su vez, identifican y eliminan directamente los agentes patógenos.⁵⁰⁰ El principal receptor de chemerina CMKLR1 se expresa en macrófagos, en diversos subtipos de células dendríticas y en células Natural Killer (NK), y en la mayoría de casos estas células responden a la chemerina mediante la activación de integrinas, señalización mediante la movilización de calcio intracelular y quimiotaxis, como se ha podido comprobar en una amplia variedad de estudios *in vitro* llevados a cabo en células y tejidos tanto humanos como murinos.^{495,523,550,551} Debido a estos hallazgos, se ha hipotetizado que la chemerina actuaría en las células del sistema inmune como un regulador de la función y tráfico celular,⁵⁰³ activándose durante los procesos de coagulación e inflamación, permitiendo la quimiotaxis y movilización de células del sistema inmune al lugar de la lesión.⁴⁹³

7.2.- La chemerina como adipokina

El estudio de la función de la chemerina en el tejido adiposo, tanto en el desarrollo de los propios adipocitos como en la regulación del metabolismo lipídico, no fue establecida hasta casi 10 años después de descubrir su función en el sistema inmune.⁴⁹⁶ El interés en el estudio de la chemerina, más allá de sus función como una mera molécula quimiotáctica, surgió después de que varios estudios empezaran a ver cierta asociación entre sus niveles séricos, la obesidad y otros componentes del síndrome metabólico.⁴⁹⁶

Goralski y colaboradores en 2007 encontraron que tanto la chemerina como su receptor CMKLR1 se expresaban a altas concentraciones en el tejido adiposo blanco.⁴⁹⁹ Además, mediante el uso de cultivos celulares 3T3-L1 diferenciados a adipocitos pudieron confirmar que los adipocitos producen prochemerina y pueden procesarla a la forma activa.⁴⁹⁹ Estos datos indicaban claramente que el tejido adiposo blanco es una fuente dinámica y modificable en la producción de la chemerina. El proceso por el cual el tejido adiposo era capaz de transformar la prochemerina en sus formas activas fue aclarado posteriormente gracias a diversos trabajos en los que se confirmó que el tejido adiposo blanco era capaz de secretar proteasas como la catepsina G y la triptasa que, a su vez, poseen la habilidad de generar las isoformas activas de la chemerina.⁵³⁹ Al mismo tiempo, también se sugirió una posible función de la chemerina a nivel autocrino/paracrino, puesto que se había podido observar que la chemerina activa se producía a unos niveles muy por encima del mínimo fisiológico necesario para activar el receptor CMKLR1, expresado también por el tejido adiposo blanco.⁴⁹⁹ Se planteó así la hipótesis de que la chemerina podría desempeñar un papel en la adipogénesis y el desarrollo del tejido adiposo, y para demostrarlo, el equipo de Goralski⁴⁹⁹ abolió la expresión de la chemerina y de su receptor CMKLR1 antes, durante y después de la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 a adipocitos maduros: los resultados mostraron que si la expresión era anulada antes de la diferenciación, los adipocitos no eran capaces de desarrollarse correctamente, mientras que si se anulaba la expresión durante el ciclo de maduración, se reducía la expresión de genes involucrados en la homeostasis de la glucosa y lípidos, y se alteraban funciones metabólicas en los adipocitos maduros.⁴⁹⁹ También se confirmó que el receptor CMKLR1 se expresaba a niveles altos en los adipocitos maduros, y si la expresión de la chemerina y su receptor se suprimían en los adipocitos maduros, la morfología de estas células cambiaba.⁴⁹⁹ Otros

autores han confirmado que los niveles de ARNm de la chemerina y su receptor permanecen elevados en adipocitos maduros, e incluso se encuentran más elevados en ratones alimentados con dietas altas en grasa, poniendo de manifiesto que la chemerina continua desarrollando una importante función en los adipocitos maduros.⁵¹¹ Los estudios llevados a cabo en humanos también han encontrado una correlación positiva entre los niveles séricos de la chemerina y el colesterol LDL y una correlación negativa entre los niveles de chemerina y el colesterol HDL en pacientes obesos.⁵⁵²

La mayoría de los datos sugieren una producción diferencial de la chemerina y señalan hacia el tejido adiposo blanco visceral como el más importante e influyente en los niveles de chemerina en suero,^{496,553} aunque el hígado continúa siendo el mayor productor de esta molécula.⁴⁹⁶ Además, también se ha confirmado la expresión de chemerina en el tejido adiposo perivascular donde podría desempeñar un papel como vasoconstrictor endógeno, puesto que se ha descubierto que su receptor CMKLR1 se expresa en la túnica media y en el endotelio vascular donde es activado por la chemerina causando la contracción del músculo liso de los vasos sanguíneos.⁵⁵⁴

Finalmente, además del papel de la chemerina en la diferenciación y el metabolismo del tejido adiposo, los estudios llevados a cabo por Takahashi y colaboradores en 2008 en adipocitos 3T3-L1 sugieren que el tratamiento con chemerina mejora la respuesta a la insulina en este tipo celular, incrementando la captación de glucosa dependiente de la insulina hasta en un 41%.⁵⁵⁵ Este mismo grupo ha podido constatar que tanto la chemerina como el CMKLR1 se expresan en las células β , responsables de sintetizar y segregar la insulina del páncreas humano.⁵⁵⁶ Adicionalmente, han comprobado que la deficiencia de la chemerina en este tipo celular en páncreas de ratón provoca una disminución en la expresión del factor de transcripción MafA, fundamental y necesario para el correcto funcionamiento de estas células, y cuya deficiencia provoca intolerancia a la glucosa.⁵⁵⁶ Sin embargo, también existen trabajos en los que se ha podido comprobar que en células humanas de músculo esquelético el tratamiento con chemerina induce resistencia a la insulina.⁵⁰⁴ El conjunto de estos estudios indica que la chemerina tiene efectos en la regulación de la función de las células β productoras de insulina, y también juega un papel en la homeostasis de la glucosa, regulando la sensibilidad a la insulina de una forma que depende del tejido o tipo celular.⁵⁵⁶

La chemerina parece desempeñar un papel también a nivel de los órganos reproductores, concretamente en el ovario, ya que esta adipokina y sus receptores CMKLR1, GPR1 y CCRL2 también ha sido identificados en diferentes partes del ovario en bovinos y humanos,^{490,492,557,558} e incluso a nivel de la placenta en humanos,⁴⁹⁹ lo que sugiere una función autocrina/paracrina de la chemerina en estos tejidos y células. Además, se ha confirmado en humanos la presencia de chemerina y su receptor CMKLR1 en las células de la granulosa que envuelven al ovocito, y su capacidad de provocar una disminución en la producción de esteroides (la progesterona y el estradiol) a través de un descenso en la activación del factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-1) en estas células.⁵⁵⁷ En experimentos *in vitro* llevados a cabo en cultivos celulares de células de la granulosa bovinas se ha observado que la insulina, el IGF-1 y los antidiabéticos metformina y rosiglitazona incrementaban la síntesis de ARNm de la chemerina, mientras que, por el contrario, disminuían la producción de ARNm de todos los receptores de la chemerina.⁵⁵⁸ A su vez, el TNF- α y la adiponectina incrementaban tanto la síntesis de la chemerina como la de su receptor CMKLR1.⁵⁵⁸ Además, la chemerina también tenía la capacidad de disminuir la síntesis de hormonas esteroideas inducida por la FSH (hormona foliculoestimulante) a través de CMKLR1 y producir un arresto en el desarrollo de los ovocitos.⁵⁵⁸

7.3.- La chemerina y el síndrome metabólico

El síndrome metabólico constituye una combinación de condicionantes patológicos entre los que se incluyen la obesidad, la dislipemia, la intolerancia a la glucosa, la resistencia a la insulina, la hipertensión y la esteatosis hepática, y que se puede utilizar como índice predictor de la aparición de enfermedades cardiovasculares.^{31,32} Existen numerosos trabajos que refuerzan la hipótesis de que la chemerina está fuertemente asociada con componentes del síndrome metabólico y que podría jugar un papel importante en la fisiopatología de la obesidad y del propio síndrome metabólico.^{496,559–}

563

A medida que aumenta la obesidad en los individuos, sus adipocitos se agrandan y el tejido adiposo sufre alteraciones que afectan al metabolismo e inflamación a nivel sistémico.⁴ Existen numerosos trabajos en los que se ha podido determinar que los niveles en suero de marcadores inflamatorios como la chemerina, el TNF- α , la IL-6 y la proteína C reactiva están elevados en estados de obesidad, donde además, el tejido

adiposo aparece como una fuente sustancial de ese tipo de citoquinas proinflamatorias, entre las que se encuentra la propia chemerina.⁵⁶⁴⁻⁵⁶⁸ Además, la obesidad se correlaciona con un incremento significativo en la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo blanco, donde pueden llegar a constituir un gran porcentaje de las células del tejido.^{569,570} Esta infiltración de macrófagos produce más citoquinas proinflamatorias, que pueden llegar a interferir con la señalización de la insulina y, de esta forma, exacerbar todavía más la resistencia a la insulina.⁵⁶⁶ Además, se ha podido confirmar en pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica que al reducirse drásticamente un alto volumen de tejido adiposo los niveles de chemerina en suero también disminuyen, a la vez que los niveles de triglicéridos, el índice HOMA-IR (modelo homeostático de evaluación de la resistencia en insulina, por sus siglas en inglés), y los niveles de glucosa en sangre.^{571,572}

La chemerina también está asociada con otro de los componentes del síndrome metabólico: la esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), así como también con la fibrosis hepática y la cirrosis.⁵⁷³ En la acumulación patológica de grasa en el hígado o esteatosis hepática no alcohólica (EHNA) tanto la inflamación como la homeostasis metabólica juegan un papel determinante en la progresión de la esteatosis, hepatitis y cirrosis.⁵⁷³ El equipo de Kukla⁵⁷⁴ ha determinado que los niveles en suero de la chemerina se correlacionan positivamente en pacientes con EHNA con la progresión de la patología y con el índice HOMA-IR, que evalúa la presencia de resistencia a la insulina mediante la medición de la glucemia y la insulinemia en ayunas.⁵⁷⁴ Aunque los estudios son de base epidemiológica, estos resultados sugieren que la chemerina podría desempeñar un papel determinante en la patogénesis de la esteatosis hepática no alcohólica, tanto a nivel inflamatorio como en la resistencia a la insulina, conduciendo a la acumulación de lípidos a nivel hepático propio de esta enfermedad.⁵⁷⁴ Estos hallazgos han sido apoyados por trabajos adicionales llevados a cabo en niños y adultos, y que proponen a la chemerina como un marcador efectivo a la hora de predecir la esteatosis hepática.^{572,575}

En estudios recientes se ha descubierto que, tanto la chemerina como su receptor CMKLR1, se expresan en la pared vascular de la aorta y arterias vasculares de humanos, y además el receptor CMKLR1 se expresa tanto en el endotelio de los vasos sanguíneos como también en las capas de músculo liso subyacentes, lo que podría tener

implicaciones y estar relacionado con componentes del síndrome metabólico como la hipertensión y la aterosclerosis, como han sugerido ya diversos autores.^{554,576} El hecho de que se observara en estos trabajos una correlación entre los niveles de expresión de la chemerina y CMKLR1 y el grado de severidad de la placa aterosclerótica, apoyan la hipótesis de que la expresión local de la chemerina dentro de la pared vascular y su actuación a través de su receptor CMKLR1 podrían actuar como desencadenante en las interacciones entre células y contribuir en la progresión de la placa ateromatosa⁵⁷⁶ (Figura 46).

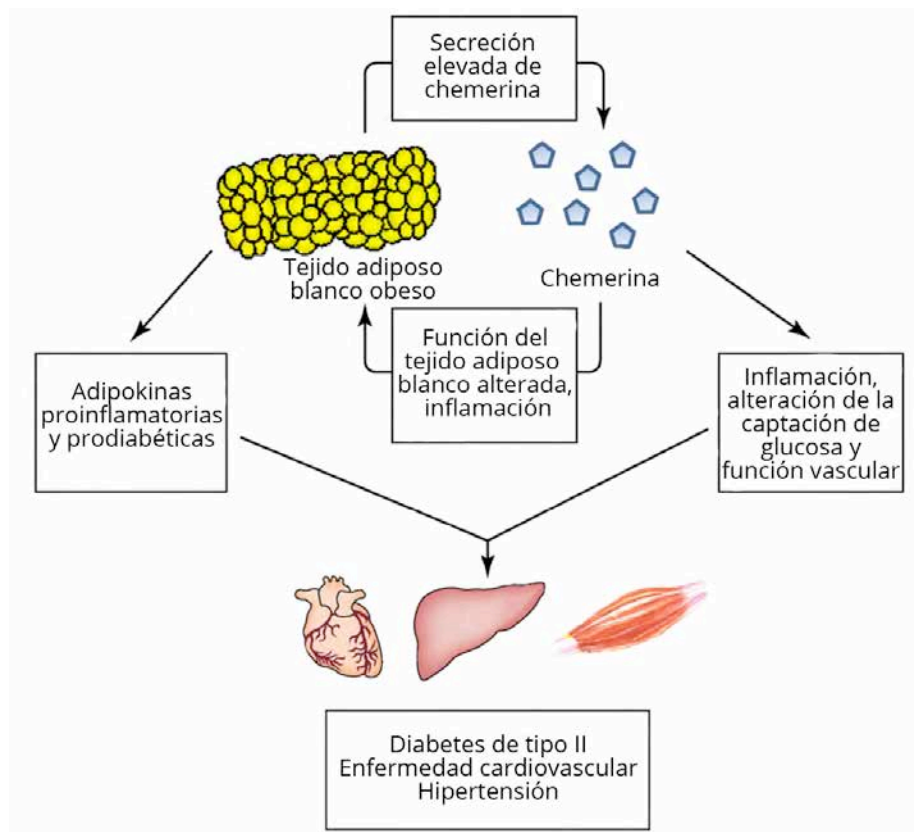


Figura 46: Obesidad, inflamación y chemerina. La secreción de la chemerina por el tejido adiposo blanco se encuentra elevada en la obesidad. La chemerina es una adipocitoquinas proinflamatoria que, a su vez, desencadena un aumento de otras adipocitoquinas proinflamatorias y prodiabéticas y, en su conjunto afecta y modifica la función metabólica del tejido adiposo y tiene efectos negativos a nivel sistémico. Estos efectos negativos incluyen un aumento de la resistencia a la insulina, alteraciones en el metabolismo de lípidos y glucosa y una disminución en la función vascular en otros tejidos. Todos estos cambios en la homeostasis metabólica y la función vascular podrían tener una implicación en el desarrollo de la diabetes mellitus de tipo II, la hipertensión y enfermedades cardiovasculares.⁵³⁹

La hipertensión es uno de los componentes del síndrome metabólico y una patología de gran relevancia dada sus proporciones epidémicas.⁵⁷⁷ La pared vascular es un órgano

activo con componentes celulares que responde a estímulos fisiológicos y patológicos y que participa en patologías y alteraciones vasculares como la hipertensión y la aterosclerosis.⁵⁷⁸ A nivel vascular, el óxido nítrico (NO) generado por la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) es crítico a la hora de determinar el tono de los vasos sanguíneos, así como también en la homeostasis de la pared vascular.^{579,580}

Recientemente, se ha señalado a la chemerina como un vasoconstrictor endógeno que ejercería su función a través del receptor CMKLR1 en arterias de rata.⁵⁵⁴ Además, Neves y colaboradores comprobaron en 2014 que la chemerina tiene la capacidad de provocar una disminución en la producción de óxido nítrico (NO) y la señalización en la vía del óxido nítrico/GMP cíclico (NO/cGMP) en aorta de rata, lo que se traduciría en una disminución de la relajación de la vasculatura, apoyando los resultados de estudios previos y la relación de la chemerina con la hipertensión y la aterosclerosis.⁵⁸¹

7.4.- La chemerina y el sistema cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la causa más común de muerte e incapacidad a nivel mundial.⁸⁷ Por este motivo, se ha puesto un gran énfasis por parte de la comunidad científica en el descubrimiento y estudio de nuevos factores de riesgo y vías metabólicas que pudiesen aportar soluciones en la prevención y manejo de las ECV.^{10,20,44,87,582} En los últimos años han surgido numerosos trabajos que han comenzado a relacionar a la chemerina con el sistema cardiovascular, pero siempre de forma tangencial o de una manera secundaria: como quimioquina circulante en sangre y fluidos inflamatorios e implicada en procesos inflamatorios,⁴⁹⁰ e induciendo cambios en la adhesión celular a nivel de las células endoteliales,⁵⁸³ como adipokina provocando alteraciones en los niveles de lípidos e intolerancia a la glucosa⁵⁵⁶ y en el crecimiento y remodelado de los vasos sanguíneos.^{584,585} Incluso sus niveles séricos aparecen relacionados con cardiopatías coronarias.⁵⁸⁶

A día de hoy, exceptuando los estudios epidemiológicos llevados a cabo en los últimos años, no existe un gran número de trabajos científicos que hayan podido establecer, de una forma clara y directa, la relación de la chemerina con el sistema cardiovascular. Los primeros pasos los emprendieron los equipos de Wittamer⁴⁹⁰ y Goralski,⁴⁹⁹ que

determinaron la expresión de la chemerina y su receptor CMKLR1 en diferentes tejidos, entre ellos el corazón, en humano y otras especies animales.^{490,499}

El primer estudio del efecto de la chemerina en cardiomiocitos fue llevado a cabo en 2014 por el grupo de Zhang.¹⁰⁰ Este trabajo, realizado con cardiomiocitos neonatales de rata, demostró que estas células expresaban tanto la chemerina como el receptor CMKLR1 y que, al igual que en el músculo esquelético, el tratamiento con chemerina era capaz de inducir resistencia a la insulina en los cardiomiocitos, provocando un descenso en la captación de glucosa y fosforilación de AKT y de las MAP quinasas p38 y ERK1/2.¹⁰⁰ Este estudio, aunque implica un avance en comprensión del efecto de la chemerina a nivel cardiomiocitario, no ha podido profundizar en los mecanismos moleculares implicados en los efectos observados.

A nivel de la vasculatura, se han realizado trabajos que los que se sugiere que la chemerina podría desempeñar un papel importante promoviendo la aterogénesis, puesto que fomenta el desarrollo de la inflamación a nivel vascular mediante el reclutamiento de macrófagos a los vasos sanguíneos inflamados y afectados.⁵⁵¹ Kostopoulos y su equipo⁵⁷⁶ demostraron que la expresión de la chemerina y CMKLR1 en aorta y vasos sanguíneos coronarios se encontraba correlacionada con la presencia de aterosclerosis⁵⁷⁶ y, adicionalmente, se ha podido comprobar que la chemerina tiene la capacidad de provocar una disminución de la relajación de los vasos sanguíneos mediante la reducción en la producción de NO y la activación de la ruta NO/GMPc en aorta de rata, lo que avalaría los resultados de los estudios previos y la relación de la chemerina con la hipertensión y la aterosclerosis.⁵⁸¹ En experimentos *in vitro* llevados a cabo con células humanas de endotelio vascular también se ha comprobado que la chemerina induce angiogénesis mediante la activación de MAPK, AKT y metalopretasas de matriz como MMP-2 y MMP-9, lo que sugiere que podría estar implicada en el crecimiento y remodelado de vasos sanguíneos.⁵⁸⁴

A pesar de que los trabajos experimentales no son muy numerosos, sí existe un elevado número de estudios epidemiológicos llevados a cabo en pacientes y en los que se ha tratado de establecer la posible relación entre los niveles de chemerina circulantes y diversas patologías cardiovasculares. Existen estudios donde los niveles séricos de chemerina se han encontrado significativamente más elevados en pacientes con

hipertensión arterial con respecto a individuos sanos y, a su vez, los niveles de chemerina se encuentran asociados con numerosos componentes del síndrome metabólico como el IMC, la presión sistólica, la glucosa en ayunas, la insulina, los triglicéridos y el colesterol; y también con marcadores de inflamación como la proteína C reactiva, el TNF- α e IL-6.⁵⁶³

Trabajos como el de Leisher y colaboradores en 2015 han demostrado que los altos niveles de chemerina en plasma no solo predicen la insuficiencia renal, sino que también son indicativos de un incremento significativo en el riesgo de futuros eventos cardiovasculares en pacientes.⁵⁸⁷ También se ha encontrado que los niveles en plasma de la chemerina se correlacionan negativamente con la fracción de eyección del ventrículo izquierdo en pacientes con síndrome coronario agudo, pero no así en pacientes con angina de pecho estable, lo que sugiere que la chemerina estaría asociada con la función cardíaca alterada en los pacientes en la fase crítica de la enfermedad de obstrucción de las arterias coronarias.⁵⁸⁸ Junto con estos resultados, también se ha podido comprobar que los niveles en plasma de la chemerina se encuentran significativamente más elevados en pacientes con miocardiopatía dilatada con insuficiencia cardíaca manifiesta con respecto a los pacientes control.¹⁰²

Algunos estudios han sugerido que los niveles de la chemerina en suero no son un factor de riesgo en pacientes con enfermedad cardíaca coronaria,⁵⁸⁹ mientras otros han mostrado que los niveles circulantes de la chemerina están positivamente correlacionados con el índice de masa corporal, el perímetro abdominal, los triglicéridos, el colesterol LDL y la proteína C reactiva, y parecen ser un factor de riesgo independiente de la rigidez arterial, incluso después de ajustar por otros factores de riesgo cardiovascular.⁵⁹⁰ Así pues, aunque la chemerina se ha relacionado con la disfunción endotelial y diversas patologías cardiovasculares en numerosos estudios, también existen trabajos donde este tipo de asociación se ha puesto en entredicho. Los datos de algunos de estos estudios epidemiológicos son algo controvertidos, y el papel e implicación de la chemerina en el sistema cardiovascular y sus diversas patologías asociadas todavía no se han dilucidado de una forma integral y satisfactoria.

8.- Chemerina y procesos inflamatorios

Si bien es cierto que la función de la chemerina puede depender de cómo esta sea procesada y donde ejerza su efecto, en una mayoría de estudios se propone que puede actuar como un agente proinflamatorio.^{508,591-596} Existe una amplia bibliografía sobre estudios llevado a cabo con la chemerina, y de todos los trabajos publicados en distintos sistemas, en una amplia mayoría se ha encontrado como nexo algún parámetro relacionado con procesos inflamatorios donde la chemerina podría desempeñar un papel determinante, ya sea bien a nivel de inflamación sistémica, en patologías tan importantes desde el punto de vista de su prevalencia como la diabetes mellitus de tipo II, la aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares, o bien en otros procesos fisiopatológicos muy diversos.^{508,592-599} Basándonos en todos estos datos, consideramos como una de las funciones más relevantes de la chemerina la regulación de procesos inflamatorios y su papel como molécula proinflamatoria.

A pesar del hipotético papel proinflamatorio de la chemerina, algunos autores han propuesto no obstante que podría desempeñar también un papel antiinflamatorio en determinadas circunstancias.^{533,583} Sin embargo, debería tenerse en consideración que algunos de estos estudios han sido llevados a cabo con péptidos sintéticos generados *in vitro*, que no se corresponden con la proteína completa que conforma la chemerina, y que en ningún momento se ha podido aislar de forma natural una forma de la chemerina que posea esta actividad antiinflamatoria.⁵³³ En concreto, Cash y colaboradores en 2008 demostraron en modelos murinos que la rotura proteolítica de la chemerina de ratón por determinadas proteasas podría originar una forma de la chemerina con actividad antiinflamatoria, y que el péptido sintético de 15 aminoácidos (chemerina C15) también posee dicha actividad antiinflamatoria, mediada a través de CMKLR1 en macrófagos.^{533,600} Yamawaki y colaboradores comprobaron asimismo en 2012 que el tratamiento con la chemerina recombinante humana podría, por sí misma, ejercer un efecto antiinflamatorio a través del receptor CMKLR1 mediante la inhibición de la fosforilación de NF- κ B y p38, y mediante la inhibición de la expresión de la molécula de adhesión vascular VCAM-1 inducida por TNF- α en células endoteliales de vena umbilical humana y en tejido aórtico de rata.⁵⁸³ Además, también se han descrito mediante el tratamiento con chemerina recombinante efectos antiinflamatorios en modelos murinos de asma,⁶⁰¹ y en células endoteliales de vena

umbilical humana.⁶⁰² Sin embargo, algunos de estos resultados no han podido ser replicados posteriormente; en concreto Bondue y colaboradores (2012) no pudieron replicar los efectos antiinflamatorios que habían sido observados previamente por Cash y colaboradores con el péptido sintético chemerina C15,⁶⁰³ y Pohl y colaboradores (2015) comprobaron en un modelo murino de inflamación hepática que el tratamiento con chemerina C15 tampoco era capaz de mejorar ni producir cambio alguno en el estado inflamatorio.⁶⁰⁴

Por lo tanto, el posible efecto proinflamatorio o antiinflamatorio de la chemerina sigue siendo un tema controvertido, aunque los estudios que le atribuyen una función proinflamatoria están mejor documentados y superan ampliamente en número a los que apoyan que su función es antiinflamatoria. Una hipótesis barajada por varios autores sería que la chemerina podría promover el inicio del proceso inflamatorio, y modular o finalizar dicho proceso en algunas circunstancias mediante una posible función antiinflamatoria.⁴⁹⁷

La chemerina parece estar interrelacionada con otras moléculas proinflamatorias, puesto que se visto que puede modificar los niveles de expresión de TNF- α , aunque también existen trabajos en los que se ha constatado una relación inversa, en la que el TNF- α puede influenciar los niveles de producción de la chemerina.⁵¹⁴ Parlee y colaboradores comprobaron en 2010 que el tratamiento con TNF- α en los adipocitos diferenciados de la línea celular 3T3-L1 de ratón incrementaba los niveles de la chemerina activa en el medido de cultivo celular.⁵¹⁴ Aunque el hígado es uno de los mayores productores de chemerina a nivel corporal,⁴⁹⁶ los mismos experimentos llevados a cabo tanto en hepatocitos primarios de ratón como en ratones vivos no demostraron que el TNF- α fuese capaz de inducir efectos similares en la producción de chemerina, lo que indicaría que el efecto del TNF- α es dependiente del tejido.⁵¹⁴ Sin embargo, en experimentos *in vivo* con ratones si se pudo constatar que el TNF- α producía un aumento en los niveles séricos tanto de la chemerina total como de la chemerina activa.⁵¹⁴ La expresión de la chemerina también se encuentra asociada de forma significativa con otros marcadores de inflamación como TNF- α e ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1) a nivel renal en ratas diabéticas.⁵⁰⁸

Se ha podido confirmar que la chemerina es producida por condrocitos humanos y murinos en cultivo, y que su producción se ve incrementada por moléculas inflamatorias como el IL-1 β (Interleuquina 1 beta).⁵⁰⁹ Estos estudios sugieren que la chemerina podría estar implicada en la estimulación de la inflamación en este tipo de células (presentes en el cartílago y fundamentales para el mantenimiento de la matriz cartilaginosa mediante la producción de colágeno y proteoglicanos, a través de un aumento de la secreción de citoquinas y metaloproteinasas) causando la destrucción de las superficies articulares en la artritis.^{495,509,605} Adicionalmente, se ha podido confirmar la presencia de la chemerina en el líquido sinovial en pacientes con artritis reumatoide, osteoartritis y artritis psoriásica.⁶⁰⁶

A pesar de que la primera función que se identificó de la chemerina, mediada a través de su receptor CMKLR1, fue la de promover la quimiotaxis de las células dendríticas inmaduras y de los macrófagos,⁴⁹⁰ actualmente se sabe que los niveles séricos de la chemerina se correlacionan positivamente con los niveles de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α , la IL-6 (Interleuquina 6) y la proteína C reactiva;^{607,608} y se ha propuesto a la chemerina como una adipokina que puede desempeñar un papel fundamental en enfermedades autoinmunes e inflamatorias.^{508,534} Existen datos que sugieren que la chemerina podría ser responsable de controlar el inicio y la progresión de la inflamación en la psoriasis, estando involucrada en el reclutamiento de varias células del sistema inmune hacia las lesiones.⁶⁰⁹ Además, se ha podido observar una correlación entre la chemerina y enfermedades inflamatorias intestinales como la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn, en las que los niveles circulantes de la chemerina son más elevados que en individuos sanos.⁶¹⁰

En pacientes con pancreatitis crónica también se han podido constatar niveles séricos de la chemerina elevados y correlacionados positivamente con las concentraciones de citoquinas profibróticas como el TGF β -1 (factor de crecimiento transformante beta 1) y el PDGF-BB (factor de crecimiento derivado de plaquetas BB), que desempeñan un papel importante en la fibrosis pancreática.⁶¹¹

La chemerina también parece intervenir en la homeostasis renal, puesto que se ha podido observar que sus niveles séricos son más elevados en pacientes con función renal comprometida y sometidos a hemodiálisis crónica.⁶¹² Además, también se ha

encontrado una posible relación de la chemerina y CMKLR1 con el reclutamiento de células dendríticas y con la alteración de la expresión de moléculas inflamatorias en pacientes afectados por lupus eritematoso sistémico en los que el riñón sufre de glomerulonefritis.⁵⁰⁸

La inflamación es un factor de riesgo importante de padecer cáncer y la chemerina ha sido propuesta como un marcador inflamatorio en distintas neoplasias debido a que se ha comprobado que la chemerina se secreta por miofibroblastos tumorales de pacientes, y actúa reclutando células madre mesenquimales (que contribuyen a la progresión del cáncer) al tumor, lo que hace que la chemerina se postule como un regulador de la progresión de ciertos tipos de cáncer.^{613,614} Asimismo, en otros estudios también se ha encontrado que los niveles circulantes de chemerina están elevados de forma significativa en pacientes con cáncer de colon⁵⁹⁵ y cáncer gástrico.^{615,616}

A nivel cardiovascular, la chemerina promueve el desarrollo de la inflamación vascular mediante el reclutamiento y adhesión de macrófagos a los vasos sanguíneos inflamados en modelos murinos, pudiendo contribuir en la progresión de la aterosclerosis.⁵⁵¹ En estudios recientes llevados a cabo en modelos animales se ha podido observar en aorta de rata que la chemerina reduce la producción de NO, disminuye la vía NO/GMPc, reduce la relajación vascular y aumenta el estrés oxidativo, lo que podría conducir a la disfunción vascular.⁵⁸¹

La chemerina también puede ser activada por proteasas implicadas en la coagulación, fibrinólisis y otras vías inflamatorias en humano,⁴⁹⁴ y su expresión se encuentra correlacionada con la presencia de aterosclerosis en la aorta y las arterias coronarias humanas, lo que apoyaría su papel en la progresión de la aterosclerosis.⁵⁷⁶ Además, en experimentos llevados a cabo con células endoteliales humanas de aorta, el tratamiento con chemerina ha demostrado que es capaz de incrementar de forma significativa la generación de especies reactivas de oxígeno, amentar los procesos de autofagia e inducir angiogénesis.⁶¹⁷

Los niveles de chemerina en suero se correlacionan positivamente y de forma significativa con distintos factores de riesgo cardiometabólicos, marcadores de inflamación (como la proteína C reactiva, el TNF- α o la IL-6) y patologías

cardiovasculares como la enfermedad coronaria o la hipertensión, en estudios llevados a cabo en humanos.^{589,618,619} En otros trabajos también se ha podido demostrar que los niveles plasmáticos de chemerina están asociados con la disfunción endotelial y con la aterosclerosis en pacientes hipertensos.⁶²⁰ En pacientes con síndrome coronario agudo los niveles plasmáticos de chemerina se correlacionan positivamente con marcadores de inflamación como la proteína C reactiva y se encuentran significativamente más elevados que en pacientes control.⁵⁸⁸ Además, en pacientes tratados con olmesartán, antihipertensivo que ha demostrado tener efectos antiinflamatorios y reducir la resistencia a la insulina, se ha podido constatar que los niveles plasmáticos de la chemerina se encuentran disminuidos con respecto a los pacientes control;⁶²¹ y, asimismo, en pacientes con enfermedad coronaria se ha podido observar que los niveles de chemerina en suero disminuyen de forma significativa al ser tratados con aspirina (antiagregante y antiinflamatorio).⁵⁹²







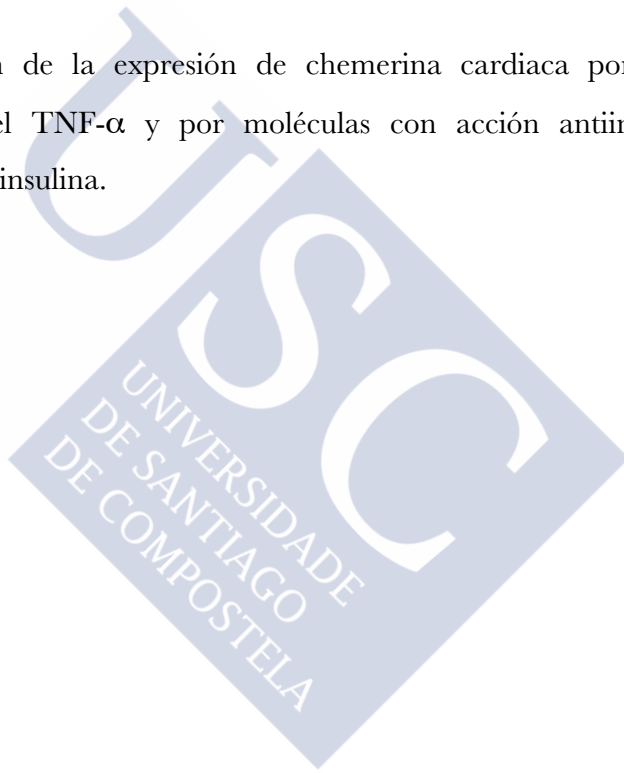
OBJETIVOS

CHEMERINA



A pesar de las evidencias que demuestran una asociación de la chemerina con las enfermedades cardiovasculares, y sobre todo con procesos inflamatorios, hasta el momento no se han estudiado sus efectos a nivel cardiomiocitario. Debido a ello, los objetivos principales de este trabajo de tesis son:

- 1.-Estudiar el papel de la chemerina sobre la viabilidad celular y el metabolismo de cardiomiocitos.
- 2.-Estudiar el posible mecanismo de acción de chemerina en cardiomiocitos mediante el estudio de la activación de cascadas de señalización intracelular.
- 3.-Estudiar la regulación de la expresión de chemerina cardiaca por mediadores proinflamatorios como el $\text{TNF-}\alpha$ y por moléculas con acción antiinflamatoria y cardioprotectora como la insulina.







MATERIAL Y MÉTODOS

CHEMERINA



Todos los reactivos utilizados, salvo que se especifique lo contrario, han sido suministrados por Sigma-Aldrich (US).

1.- Ética

La adquisición de tejido humano se llevó a cabo previo consentimiento informado de los pacientes, de acuerdo con la Declaración de Helsinki 2008, la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, la Convención Europea de los Derechos Humanos y Biomedicina (ETS 164) y la Ley de Tejidos Humanos de 2004 (UK), tras la aprobación por parte del Comité Ético de Investigación Clínica de la Xunta de Galicia. Para los experimentos *in vivo* con ratas, se utilizaron las instalaciones del animalario de la Facultade de Medicina de la Universidade de Santiago de Compostela (USC), siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki, las regulaciones del Comité Bioético de la USC y las directrices de la directiva 2010/63 de la Unión Europea. Los experimentos fueron llevados a cabo según la normativa legal vigente de experimentación animal y según la Ley 32/2007 del 7 de noviembre para el cuidado de animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, modificada por la Ley 6/2013 de 11 de junio y el Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y fines científicos.

2.- Tejidos humanos

Las muestras de aurícula humana fueron obtenidas de pacientes procedentes del Servicio de Cardiología-Cirugía Cardíaca de la Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela, que fueron sometidos a cirugía cardíaca con *bypass* cardiopulmonar. En este tipo de cirugía, con circulación extracorpórea convencional, para introducir el catéter necesario se escinde un trozo de apéndice auricular derecho que normalmente se desecha y que nosotros recogemos para experimentación.

3.- Animales

Para la determinación de los niveles de expresión de ARNm de chemerina y CMKLR1 a nivel tisular se utilizaron ratas Sprague-Dawley adultas o ratones BALB/C alimentados *ad libitum* con dieta estándar del animalario (2.9 kcal/g, 3.10% de grasa, 16.1% de proteína) (Scientific Animal Food & Engineering, FR) que fueron sacrificadas por decapitación.

Los neonatos de rata Sprague-Dawley de hasta 72 horas de vida se sacrificaron mediante dislocación cervical. Los corazones extraídos se utilizaron para realizar cultivos primarios (ver a continuación).

En todos los casos, los tejidos (corazón y tejido adiposo) fueron extraídos y congelados inmediatamente a -80°C.

4.- Cultivos Celulares

4.1.- Cultivo de cardiomiocitos adultos humanos

Se utilizaron cardiomiocitos adultos humanos (PromoCell GmbH, DE), cultivados según las instrucciones del fabricante.

4.2.- Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata

En el cultivo de cardiomiocitos neonatales de rata se utilizaron neonatos de ratas Sprague Dawley de hasta 72 horas de vida como máximo. Los cardiomiocitos presentan un número fijo de divisiones durante el desarrollo embrionario y fetal tras el cual entran en estado postmitótico.²⁹⁴ Durante las primeras 48 horas de vida de los neonatos, los cardiomiocitos todavía conservan en parte la capacidad de proliferar,²⁹⁴ por lo que tras la siembra se pueden dividir una o dos veces.

Después de su extracción, los corazones se trocearon en tres o cuatro porciones y se mantuvieron en la solución tampón ADS (6.8 g/L de NaCl, 4.76 g/L de HEPES, 0.12 g/L de NaH₂PO₄, 1.0 g/L de glucosa, 0.4 g/L de KCl, 0.1 g/L de MgSO₄ y 0.02 g/L de rojo fenol, a pH 7.4) hasta su digestión. Las digestiones fueron llevadas a cabo con la

siguiente solución enzimática: 80 unidades/mL de colagenasa tipo Ia y 0.6 mg/mL de pancreatina. Se realizaron 5 digestiones a 37°C en agitación. La primera de 30 minutos se desechó, mientras que las cuatro siguientes se recogieron y se incubaron durante 20 minutos. El volumen utilizado de solución enzimática se ajustó según el número de neonatos, manteniendo la proporción de 6 mL/digestión por cada 14 corazones. A cada una de las digestiones se le añadió un 10% de NCS (Newborn Calf Serum) (Merck Millipore, DE) y se centrifugó a 2 000 g durante 5 minutos. El número total de células obtenido se resuspendió en medio de cultivo (66% de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Lonza, CH), 17% de medio M199, 10% de FBS (Fetal Bovine Serum) (Life Technologies, US), 5% de NCS, 1% de penicilina/estreptomicina (Cámbrex, USA) y 1% de L-glutamina)) y se realizó una siembra diferencial durante 2-3 horas sobre superficies de cultivo no tratadas con matriz extracelular, con el fin de aumentar la pureza del cultivo, dejando sedimentar los fibroblastos para posteriormente desecharlos. Se recogió la suspensión celular de cardiomiocitos y se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos.

Las células obtenidas se sembraron con una densidad de 50.000 células/cm² en placas de cultivo previamente tratadas durante 24 horas con una matriz extracelular de fibronectina/gelatina. El medio de cultivo se suplementó con arabinósido de citosina (AraC) (Pfizer, US) a una dosis de 10 µM para inhibir la proliferación de los fibroblastos. El medio se renovó cada 24 horas. Con esta técnica conseguimos un grado de pureza de cardiomiocitos del 90-99% (comprobado mediante la técnica de inmunohistoquímica para la cadena pesada de la miosina), con un rendimiento de aproximadamente 10⁷ células por cada 40 neonatos.

Para realizar los experimentos se retiró previamente el suero del medio de cultivo (2-12 horas).

4.3.- Cardiomiocitos auriculares adultos de ratón: línea celular HL-1

La línea celular de cardiomiocitos de ratón HL-1 fue donada por el Dr. William C. Claycomb (Louisiana S.U., Medical Centre, New Orleans, US) y por el Dr. David Sanz Rosa (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, ES). Esta línea celular

deriva de la línea celular AT-1 de cardiomiocitos auriculares adultos de ratón pertenecientes a la cepa C57BL/6J.²⁹⁵ Las características de esta línea hacen que sea un buen modelo para el estudio del funcionamiento de los cardiomiocitos a nivel celular y molecular, puesto que, son capaces de multiplicarse conservando el fenotipo específico de las células cardíacas adultas: expresión de la cadena pesada de miosina, de α -actina cardíaca y de conexina 43, además del mantenimiento de la actividad contráctil.²⁹⁵

La línea celular HL-1 fue cultivada sobre superficies de cultivo previamente tratadas con matriz extracelular de fibronectina/gelatina durante 24 horas. Se sembraron con una densidad de 50 000 células/cm². Las células se mantuvieron en medio Claycomb suplementado con 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina (Lonza, CH) y 1% de L-glutamina (Lonza, CH). El medio de cultivo se renovó cada 24 horas. Para el mantenimiento de la línea, cuando las células alcanzaron el 90% de confluencia, se incubaron con tripsina-EDTA (Lonza, CH) durante 3-5 minutos a 37°C. La tripsina se inactivó con DMEM con un 10% de FBS y las células se centrifugaron a 2000 g durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en el medio de cultivo Claycomb suplementado realizando un pase 1:3.

Para realizar los experimentos se retiró previamente el suero del medio de cultivo (2-12 horas).

5.- Tinción vital Hoechst 33258

El Hoechst es un fluorocromo permeable a la membrana celular que se une al ADN de doble cadena. Se trata de una bisbenzidina, que se intercala en el surco menor del ADN con preferencia por las bases adenina-timina, y que presenta una longitud de onda de excitación de 350 nm y de emisión de 450 nm. Una de sus aplicaciones es la de permitir diferenciar las células vivas de las células apoptóticas, cuyos núcleos emiten un brillo más intenso con la tinción Hoechst debido a la condensación de la cromatina.

Se utilizó esta técnica para estudiar el posible papel de chemerina en la apoptosis cardiomiocitaria. Se usaron cardiomiocitos neonatales de rata y la línea celular HL-1, previamente privados de suero durante 12 horas, tratados con chemerina recombinante

de ratón (R&D Systems, US) en un rango de concentraciones de 0.1 a 100 nM y durante 12-48 horas. Tras el tratamiento, las células fueron incubadas en medio de cultivo DMEM junto con Hoechst 33258 0.5 μ M y HEPES 20 mM (pH 7.8) durante 45 minutos. Tras el período de incubación se realizó el conteo de las células apoptóticas *in vivo* en un microscopio de fluorescencia Olympus IX70 (Olympus Optical, DE). En cada punto de tratamiento o control (por duplicado) se contaron 10 campos y en cada campo 20 células, evitando contar los bordes y el centro del pocillo, lugares donde de por sí se produce más apoptosis.

6.- Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo

Este ensayo fue utilizado para determinar el posible efecto de la chemerina sobre el ciclo celular. Para ello se utilizaron cardiomiocitos neonatales de rata y la línea celular HL1, previamente privados de suero durante 12 horas, tratados con chemerina recombinante de ratón (R&D Systems, US) a una dosis de 100 nM y durante 24 horas. Finalizado el tratamiento, las células se lavaron con PBS y se les añadió tripsina-EDTA durante 3-5 min a 37°C. Tras la incubación, se añadió PBS frío para inactivar la tripsina, se recogieron las células y se centrifugaron a 2 000 g durante 5 minutos. Se resuspendieron las células sedimentadas en paraformaldehído al 4% en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente para su permeabilización y fijación. Se realizó un lavado con PBS y se centrifugó a 2 000 g durante 5 minutos. Las células sedimentadas se resuspendieron en etanol al 70% y se conservaron a -20°C durante 12 horas para su fijación. Se volvieron a realizar dos lavados con PBS y se resuspendieron las células sedimentadas en 1 mg/mL de ribonucleasa A y 40 μ g/mL de yoduro de propidio en PBS.

El yoduro de propidio es un fluorocromo que se intercala en el ADN, lo que permite determinar la cantidad de ADN presente en la célula y clasificar las fases del ciclo celular y el número de células muertas. Es necesario incubar las células con el yoduro de propidio durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. A continuación se analizaron las células mediante citometría de flujo en un citómetro FACS Aria (Becton & Dickinson, US) y con el programa FACSDiva (Becton & Dickinson, US).

La tinción con yoduro de propidio analizada por citometría de flujo permite también la caracterización de la distribución celular en cada fase del ciclo: G_0/G_1 , S, G_2/M , a través de la medición del contenido de ADN nuclear. La muerte celular implica la degradación del ADN, y, por lo tanto, las células muertas exhiben un contenido de ADN menor a $2n$. Dichas células son detectadas en la región sub G_0/G_1 o hipodiploide del histograma.

7.- Ensayo de captación de glucosa

El ensayo de captación de glucosa se utiliza habitualmente para medir el transporte y la actividad metabólica celular de la glucosa. Para ello se utiliza un análogo de la glucosa, la 2-desoxi-D-glucosa, marcada con un radioisótopo, en nuestro caso tritio (3H). La 2-desoxi-D-glucosa es un derivado de la glucosa que tiene el radical 2-hidroxilo sustituido por un hidrógeno, por lo que no es capaz de entrar en la ruta de la glucólisis. De este modo, entra en la célula y es fosforilada pero no puede ser metabolizada posteriormente, por lo que se acumula y permanece en el interior de las células. Siendo este un buen método para cuantificar la incorporación de glucosa a nivel celular.

Se usó este ensayo para determinar si la chemerina tiene efectos en la incorporación de glucosa en la línea celular HL-1. Las células se privaron de suero durante 2.5 horas y se realizaron tratamientos por duplicado en cada experimento con chemerina recombinante de ratón (R&D Systems, US) en un rango de dosis de 1-100 nM durante 12 horas. Se usó a modo de control positivo insulina a una dosis de 100 nM durante 1 hora. Las células se lavaron con tampón salino HEPES (HBS) (NaCl a 140 mM, KCl a 5 mM, $MgSO_4$ a 2.5 mM, $CaCl_2$ a 1 mM y HEPES a 20 mM, ajustado a pH 7.4) y se incubaron con 2-desoxi-D-glucosa 10 μM y 0.5 $\mu Ci/mL$ de 2-desoxi-D- 3H -glucosa (Perkin Elmer, US) en HBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las células con NaCl al 0.9% y se lisaron con 250 μL de NaOH 0.05 N. Se recogieron 50 μL para cuantificar la proteína por el método Bradford (se utilizaron 20 μL), y el resto se transfirió a viales específicos para contar la radiactividad en un contador de centelleo líquido, añadiendo a cada muestra 2 mL de líquido de centelleo Ecoscint H (National Diagnostics, US). La lectura se llevó a cabo en el

contador de centelleo líquido Tricarb® (Perkin Elmer, US), con un tiempo de lectura por muestra de 5 minutos.

La captación no específica se determinó añadiendo a células sin tratamiento citocalasina B (inhibe la incorporación de glucosa) a una concentración de 10 μ M. Los valores obtenidos en este punto se restaron de todos los demás puntos de tratamiento, considerándose ruido de fondo. Los valores de glucosa captada se expresan en cpm/mg de proteína/minutos de exposición con la glucosa marcada.

8.- Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizó como tampón de lisis el reactivo comercial TRIzol® (Thermo Scientific, US) seguido del sistema de microcentrifugaciones en columna RNeasy Mini Kit (Qiagen, DE). El TRIzol® es una solución monofásica de fenol y el agente caotrópico isocianato de guanidina que, durante la homogenización o lisis de la muestra mantiene la integridad del ARN, al mismo tiempo que disuelve los componentes celulares. La adición de cloroformo seguida de centrifugación separa la muestra en dos fases, una de ellas acuosa y la otra orgánica. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, que se recupera. A continuación utilizamos el sistema de extracción RNeasy® Mini kit (Qiagen, DE). Este sistema representa una tecnología bien estabilizada para la purificación del ARN. Este método combina las propiedades de unión selectivas de membranas basadas en gel de sílice con microcentrifugaciones, de forma que gracias a una solución tampón específica de alta concentración salina permite retener en la membrana hasta 100 μ g de ARN de más de 200 pares de bases. El etanol proporciona las condiciones de unión adecuadas del ARN a la columna, donde el ARN total se une a la membrana y los contaminantes se eluyen de forma eficiente mediante distintos lavados.

El proceso de extracción fue llevado a cabo de la siguiente forma: se lavaron con PBS las células o tejido y se añadió TRIzol® en función de la cantidad de tejido o tamaño del plato de cultivo (500-1000 μ L). Se le añadió cloroformo en proporción TRIzol:cloroformo 5:1 y se centrifugó a 12 000 g durante 15 minutos a 4°C. Se recogió la fase acuosa y se repitió el proceso con la fase recogida. A continuación, se recogió por última vez la fase acuosa y se mezcló con un volumen de etanol de 70°. A partir de este

paso se continuó la extracción utilizando las columnas del RNeasy® Mini kit siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ARN se realizó en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, US). Después de su cuantificación, el ARN se almacenó a -80°C.

9.- RT-qPCR

Se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR) para determinar la expresión génica de determinados genes de interés. Para la obtención de ADN complementario (ADNc) se partió de 1 µg ARN total y se sintetizaron 20 µL de ADNc, utilizando los reactivos y cebadores Oligo dT del RT² First Strand cDNA Kit (Qiagen, DE), siempre según las instrucciones del fabricante y en un termociclador Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, US) con un perfil térmico de 15 minutos a 42°C y 5 minutos a 95°C.

La reacción de PCR cuantitativa se realizó a partir de 1 µL de ADNc con el kit RT² Real-Time™ SYBR® Green/Rox PCR Master Mix (Qiagen, DE) siguiendo las instrucciones del fabricante y en un termociclador Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, US) con un perfil térmico de 1 ciclo de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 40 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C, con una lectura de la fluorescencia al final de cada ciclo. Se utilizaron los siguientes cebadores RT² qPCR Primer Assays (Qiagen, DE) a una concentración de 500 nM:

<i>Cebadores</i>	<i>Nº Catalogo</i>	<i>Pares de bases</i>	<i>GenBank</i>
Rarres2 de rata	PPR48247A	131	NM_001013427.1
CMKLR1 de rata	PPR06609A	152	NM_022218.2
Gapdh de rata	PP06557A	172	NM_017008.3
RARRES2 de humano	PPH02377A	96	NM_002889.3
CMKLR1 de humano	PPH02349A	165	NM_004072.2
GADPH de humano	PPH00150E	175	NM_002046.3
Rarres2 de ratón	PPM27224A	85	NM_027852.2
CMKLR1 de ratón	PPM04825A	191	NM_008153.2
Gapdh de ratón	PPM02946E	140	NM_008084.2

Como control de expresión de ADN genómico se realiza un punto sin retrotranscriptasa, y como control negativo se realiza un punto sin ARN. En los casos necesarios, se realizó un gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe® (Thermo Scientific, US) para ver el producto de amplificación, utilizando el UVP EC3 Imaging System (UVP, US) como sistema de revelado.

10.- Extracción de proteínas

Después de lavar las células con PBS (Phosphate-buffered saline) frío se añadió 6.7 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ de tampón de lisado (5% de Tris-Base a 1 M y pH 7.5, 5% de NaCl a 5 M, 30% de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 + 10\text{H}_2\text{O}$, 1% de EDTA a 0.5 M, 20% de NaF a 5 M, 10% de Triton X-100 al 10%, 1% de Na_3VO_4 a 0.1 M, 1% de PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) a 0.1 M, 1% de aprotinina, 1% de leupeptina y 25% agua ultrapura Milli-Q). Se realizó el lisado de las células a 4°C con ayuda de un raspador y se recogió el lisado a tubos de centrífuga. El lisado fue homogenizado y mezclado utilizando un agitador de tipo vórtex y, tras 30 minutos de reposo en hielo se centrifugó a 13 000 g durante 15 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se conservó a -40 °C.

11.- Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas en solución se determinó mediante el uso del método de Bradford utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, US). El procedimiento tiene su fundamento en la formación de un complejo entre el colorante Coomassie® Brilliant Blue G-250 y las proteínas, de forma que el complejo proteína-colorante causa el cambio del máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm. El colorante Coomassie se une principalmente a aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente a la arginina. La cantidad de absorción es proporcional a la cantidad de proteínas.

Para calcular la concentración de proteínas de las muestras se utilizó una recta patrón de seroalbúmina bovina (BSA), comprendida entre 2.5 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en agua MilliQ y un 20% del reactivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, US). Para la cuantificación de las muestras, se realizó una dilución 1:200 en agua MilliQ. La absorbancia se midió tras 5 minutos de incubación a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro

Ultrospec 1100 Pro (GE Healthcare Life Sciences, US). Para calcular la concentración de proteína se extrapolaron los valores obtenidos de absorbancia de las muestras en la recta patrón de BSA mediante el uso de una ecuación polinomial de segundo orden o cuadrática, con la que se obtiene una relación más precisa entre concentración y absorbancia.

12.- Western blot

Mediante la técnica de Western blot estudiamos la expresión y activación de determinadas proteínas de interés. A través de una electroforesis en gel de poliacrilamida (30% Acrylamide/Bis Solution, Bio-Rad, US), se separan las proteínas en función de su tamaño. En general, se utilizaron geles al 5% de acrilamida para proteínas de 60-200 kDa, geles al 10% para proteínas de 16-70 kDa y geles del 15% para proteínas de 12-45 kDa, con Tris-Base a 1.5 M con pH 8.8, dodecilsulfato sódico (SDS) al 10%, persulfato amónico (APS) al 10% y tetrametiletilendiamina (TEMED). Se preparó un gel concentrador sobre el gel separador, que tiene un tamaño de poro más grande. Para el gel concentrador se utilizó un 4% de acrilamida, Tris-Base a 1.5 M con pH 6.8, SDS al 10%, APS al 10% y TEMED a distintas cantidades en función del volumen final de preparación.

Las proteínas se diluyeron en tampón de carga (25% de Tris-Base a 0.5M + 0.4% de SDS con pH 6.8, 20% de glicerol, 4% de SDS, 0.2% de 2-mercaptoetanol y 0.001% de azul de bromofenol) y se incubaron a 100°C durante 5 minutos antes de cargarlas en el gel. Se utilizó como marcador de peso molecular el Precision Plus Protein Kaleidoscope (Bio-Rad, US). La electroforesis se realizó a 80 V constantes durante 3 horas en frío en tampón de electroforesis (3 g/L de Tris-Base, 14.4 g/L de glicina y 0.96 g/L de SDS), utilizando el sistema Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, US).

Finalizada la electroforesis, se procedió a transferir las proteínas del gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (GE Healthcare Life Sciences, US), previamente activada en metanol según las instrucciones del fabricante, durante 1 hora a un amperaje constante de 0.28 A en tampón de transferencia (5.81 g/L de Tris-Base, 2.93 g/L de glicina, 0.375 g/L de SDS y 5% de metanol), utilizando el sistema Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, US). Después de la transferencia la

membrana se bloqueó utilizando BSA o leche desnatada en polvo al 5% en una solución salina tamponada de Tris a pH 7,6 (TBS-T) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente, y se incubó con los anticuerpos durante toda la noche a 4°C o 1 hora a temperatura ambiente.

La membrana se reveló utilizando el kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore, DE) en el sistema de revelado UVP EC3 Imaging System (UVP, US). Para cuantificar los niveles de proteína, las imágenes obtenidas por quimioluminiscencia se analizaron mediante densitometría utilizando el programa ImageJ (National Institutes of Health, US). A continuación se detallan los anticuerpos utilizados y su dilución:

Anticuerpo	Dilución
Phospho-ERK1/2 (pThr202/Tyr204) (Thermo Scientific, US)	1:1000
ERK1/2 (Thermo Scientific, US)	1:1000
Phospho-AKT (Thr308) (Cell Signalling Technology, US)	1:1000
Phospho-AKT (Ser473) (Cell Signalling Technology, US)	1:1000
AKT (Cell Signalling Technology, US)	1:1000
Phospho-p38 (Abcam, UK)	1:1000
p38 (Abcam, UK)	1:1000
Phospho-AMPK (Thr172) (Cell Signalling Technology, US)	1:1000
AMPK α (Cell Signalling Technology, US)	1:1000
Caspase-9 (Cell Signalling Technology, US)	1:1000
GAPDH (Thermo Scientific, US)	1:1000
Chemerin (N-13) (Santa Cruz Biotechnology, US)	1:200
CMKLR1 (H-160) (Santa Cruz Biotechnology, US)	1:200

13.- ELISA de chemerina de rata

Para determinar la posible secreción de chemerina por cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo se utilizó el kit comercial Rat Chemerin ELISA (Abbexa, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante para un ELISA de tipo sandwich. La cantidad de chemerina en las muestras se extrapola a partir de una curva estándar con concentraciones conocidas de péptido purificado y suministrado también por el proveedor del kit.

14.- Análisis estadístico

En el caso de muestras con distribución normal se aplicó el test paramétrico t de Student. En el caso de muestras que no siguiesen una distribución normal se utilizaron los test no paramétricos U de Mann-Whitney (para comparar entre dos grupos), el test de los rangos con signo de Wilcoxon (para estudiar incrementos con respecto al control) y el test de Kruskal-Wallis (para compara tres o mas grupos de muestras no pareadas). Los datos se representaron como $\text{media} \pm \text{SEM}$ (error estándar de la media).

En todos los casos, se realizaron como mínimo 3 experimentos y se consideraron diferencias estadísticamente significativas si $p < 0.05$. El análisis estadístico fue llevado a cabo usando los programas SPSS 15.0 (IBM, US) o Prism5 (GraphPad Software Inc., US).





RESULTADOS

CHEMERINA



1.- Expresión génica de chemerina y CMKLR1 en cardiomiocitos humanos y murinos

Aunque otros autores ya han demostrado la expresión de chemerina y CMKLR1 a nivel cardiomiocitario,¹⁰⁰ el primer objetivo de esta tesis fue comprobar que en nuestro sistema experimental tanto la chemerina como su principal receptor se expresaban tanto a nivel de ARNm como de proteína.

La expresión de chemerina y su receptor CMKLR1 en cardiomiocitos en cultivo y en tejido cardíaco humano (Figura 47 y 48), de rata (Figura 49 y 50) y de ratón (Figura 51 y 52) fue analizada mediante RT-qPCR y Western blot. Se pudo demostrar la expresión a nivel de ARNm y proteína tanto de la chemerina como del CMKLR1 en tejido cardíaco humano (aurícula y ventrículo). Los mayores niveles de expresión de chemerina en corazón humano se observaron en tejido auricular cardíaco. Se utilizó GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) como gen normalizador tanto en la RT-qPCR como en el Western blot, donde el anticuerpo de chemerina mostró una banda de 18 kDa que coincidía con la banda correspondiente al péptido comercial de la chemerina que fue usado como control; y el anticuerpo para CMKLR1 mostró una banda de 42 kDa correspondiente con el peso de la proteína.

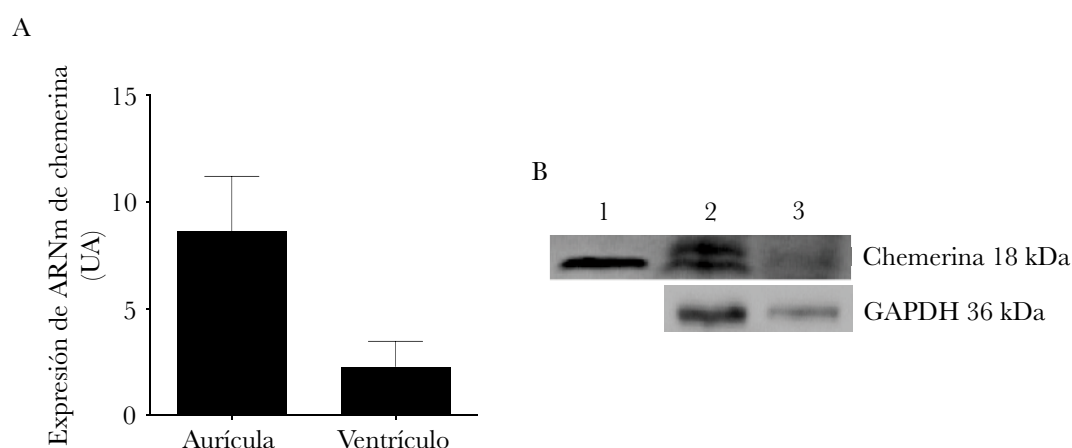


Figura 47: Expresión de ARNm y proteína de chemerina en tejido cardíaco humano. **A:** Niveles de expresión de ARNm de chemerina. **B:** Western blot representativo de la expresión de chemerina. 1: péptido comercial de referencia, 2: aurícula, 3: ventrículo,. UA: unidades arbitrarias. Datos expresados como media \pm SEM (n=4).

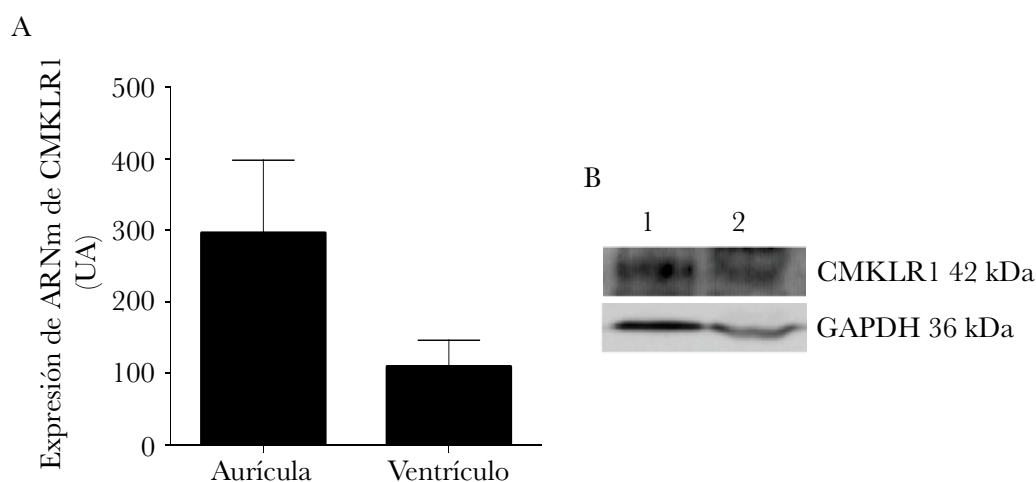


Figura 48: Expresión de ARNm y proteína del receptor CMKLR1 en tejido cardíaco humano. **A:** Niveles de expresión de ARNm de CMKLR1. **B:** Western blot representativo de la expresión de CMKLR1. 1: aurícula, 2: ventrículo. UA: unidades arbitrarias. Datos expresados como media \pm SEM (n=4).

En tejido cardíaco de rata se observaron asimismo niveles de expresión de chemerina y el receptor CMKLR1, que eran mayores en aurícula que en ventrículo. Se confirmó asimismo la expresión de chemerina y su receptor en cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo primario (Figuras 49 y 50).

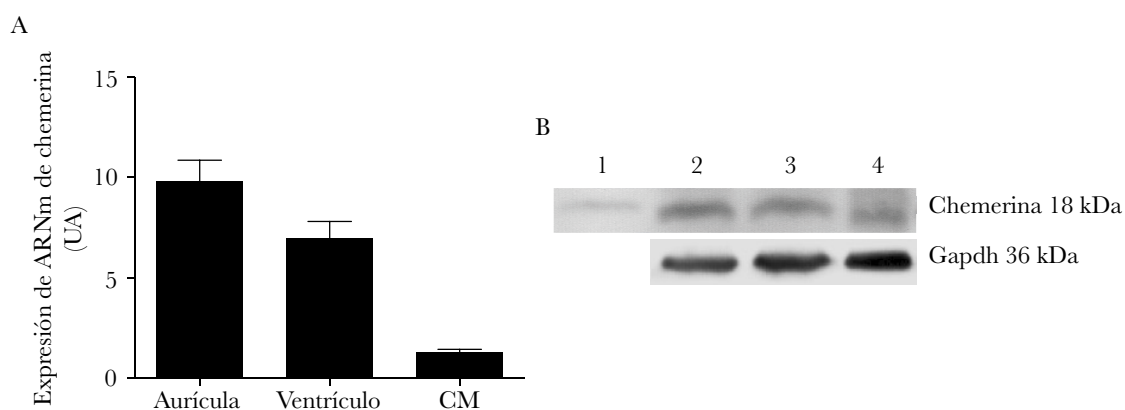


Figura 49: Expresión de ARNm y proteína de chemerina en tejido cardíaco de rata y cardiomiocitos neonatales de rata. **A:** Niveles de expresión de ARNm de chemerina. **B:** Western blot representativo de la expresión de chemerina. 1: péptido comercial de referencia, 2: aurícula, 3: ventrículo, 4: cardiomiocitos neonatales de rata. UA: unidades arbitrarias. Datos expresados como media \pm SEM (n=4).

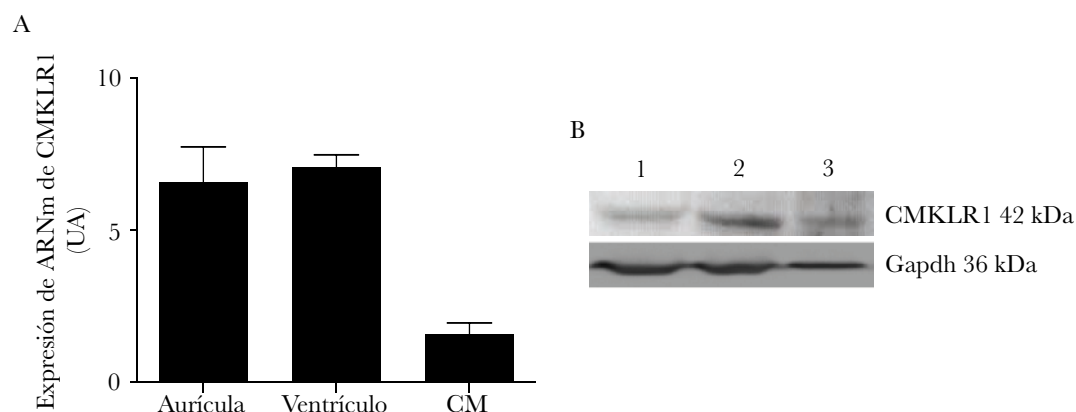


Figura 50: Expresión de ARNm y proteína de CMKLR1 en tejido cardiaco de rata y cardiomiocitos neonatales de rata. **A:** Niveles de expresión de ARNm de CMKLR1. **B:** Western blot representativo de la expresión de CMKLR1. 1: aurícula, 2: ventrículo, 3: cardiomiocitos neonatales de rata. UA: unidades arbitrarias. Datos expresados como media \pm SEM (n=4).

Finalmente, también se confirmó la expresión de chemerina y CMKLR1 en corazón de ratón y en la línea celular de cardiomiocitos adultos de ratón HL-1 (Figuras 51 y 52).

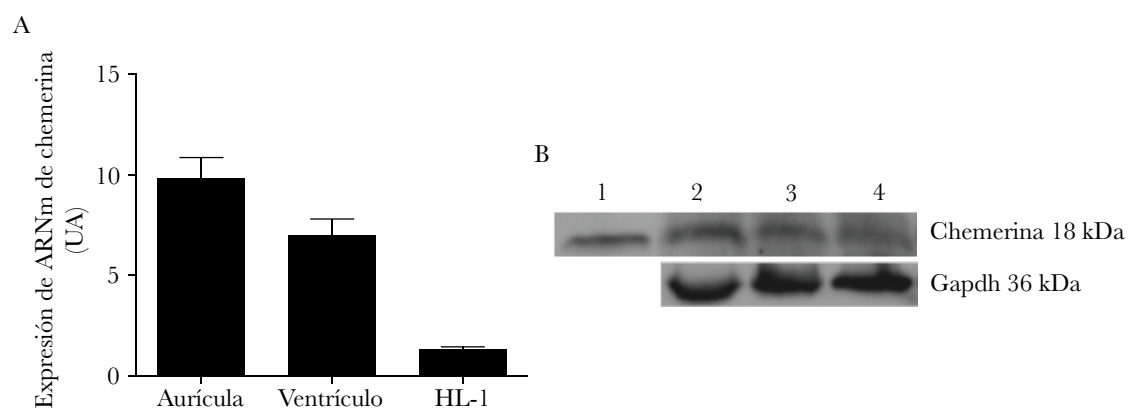


Figura 51: Expresión de ARNm y proteína de la chemerina en tejido cardiaco de ratón y cardiomiocitos HL-1. **A:** Niveles de expresión de ARNm de chemerina. **B:** Western blot representativo de la expresión de chemerina. 1: péptido comercial de referencia, 2: aurícula, 3: ventrículo, 4: cardiomiocitos HL-1. UA: unidades arbitrarias. Datos expresados como media \pm SEM (n=4).

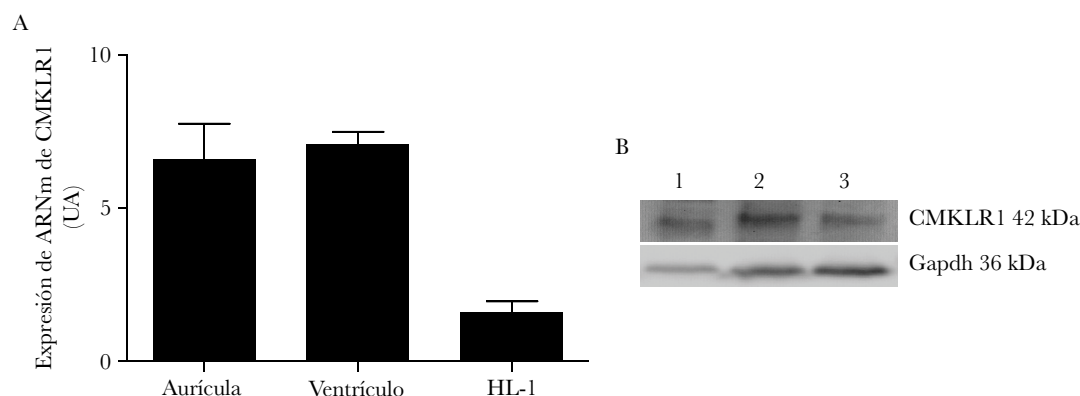


Figura 52: Expresión de ARNm y proteína de CMKLR1 en tejido cardíaco de ratón y cardiomiocitos de la línea celular HL-1. **A:** Niveles de expresión de ARNm de CMKLR1. **B:** Western blot representativo de la expresión de CMKLR1. 1: aurícula, 2: ventrículo, 3: cardiomiocitos HL-1 y 4: tejido adiposo blanco subcutáneo. UA: unidades arbitrarias. Datos expresados como media \pm SEM (n=4).

2.- Efectos de la chemerina sobre la viabilidad de los cardiomiocitos

2.1.- Tinción vital Hoechst 33258

Mediante la tinción vital Hoechst 33258 se demostró que el tratamiento con chemerina en un rango de dosis de 0.1 a 100 nM durante 48 horas incrementaba la apoptosis en las células HL-1 de forma dosis dependiente (Figura 53). La apoptosis en los cardiomiocitos HL-1 se revela a través de la fragmentación y la fluorescencia brillante azul del núcleo, después de la tinción con Hoechst 33258. Se observó un incremento en la apoptosis, respecto a los controles, estadísticamente significativo tanto a la concentración de 10 ($22.24 \pm 3.90\%$, $p < 0.05$, $n=6$) como de 100 ($30.29 \pm 6.69\%$, $p < 0.05$, $n=6$) nM.

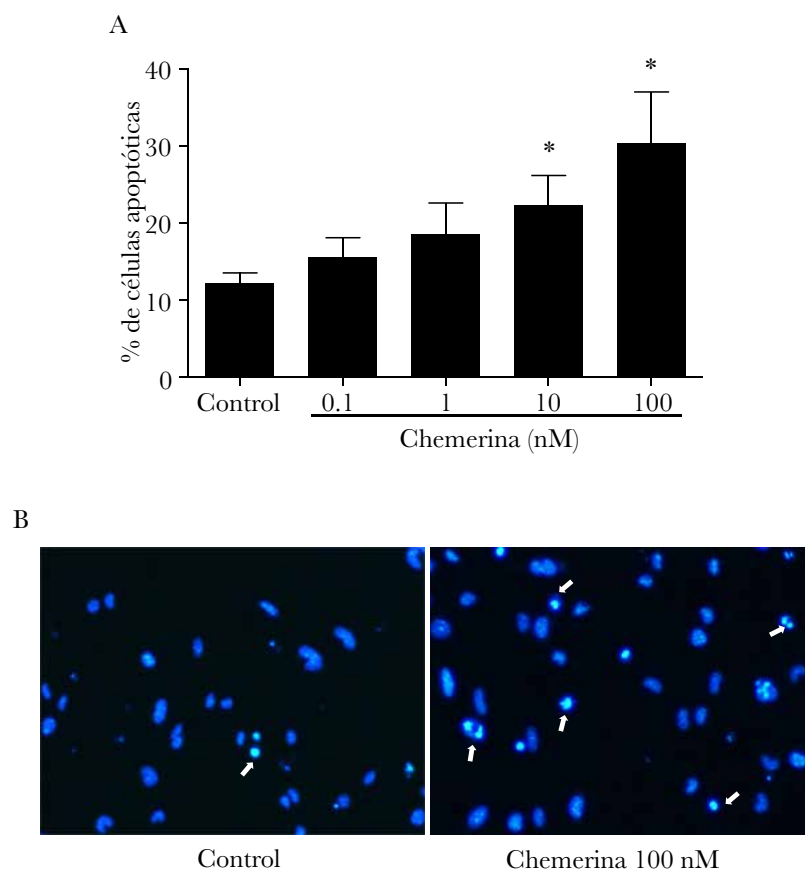
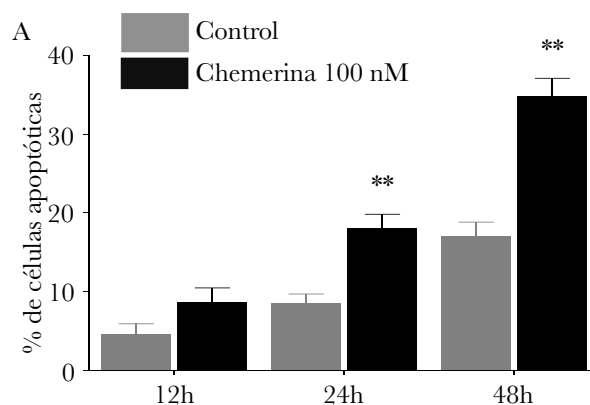


Figura 53: Resultado del análisis de apoptosis mediante la tinción vital de Hoechst en la línea celular HL-1. **A:** Las células HL-1 fueron tratadas en un rango de dosis de 0.1 a 100 nM durante 48 horas. **B:** Microfotografías (X400) de un experimento representativo (las flechas indican los núcleos con mayor intensidad de fluorescencia mostrando la fragmentación nuclear). Datos expresados como media \pm SEM, test estadístico de Mann Whitney. * $p < 0.05$ respecto al control.

Las células HL-1 fueron tratadas con la dosis 100 nM de chemerina a distintos tiempos y se demostró que la apoptosis aumentaba progresivamente con el tiempo y la diferencia con respecto a los controles era estadísticamente significativa a las 24 ($18.13 \pm 1.70\%$, $p < 0.01$, $n=6$) y 48 ($34.79 \pm 2.28\%$, $p < 0.01$, $n=6$) horas (Figura 54).



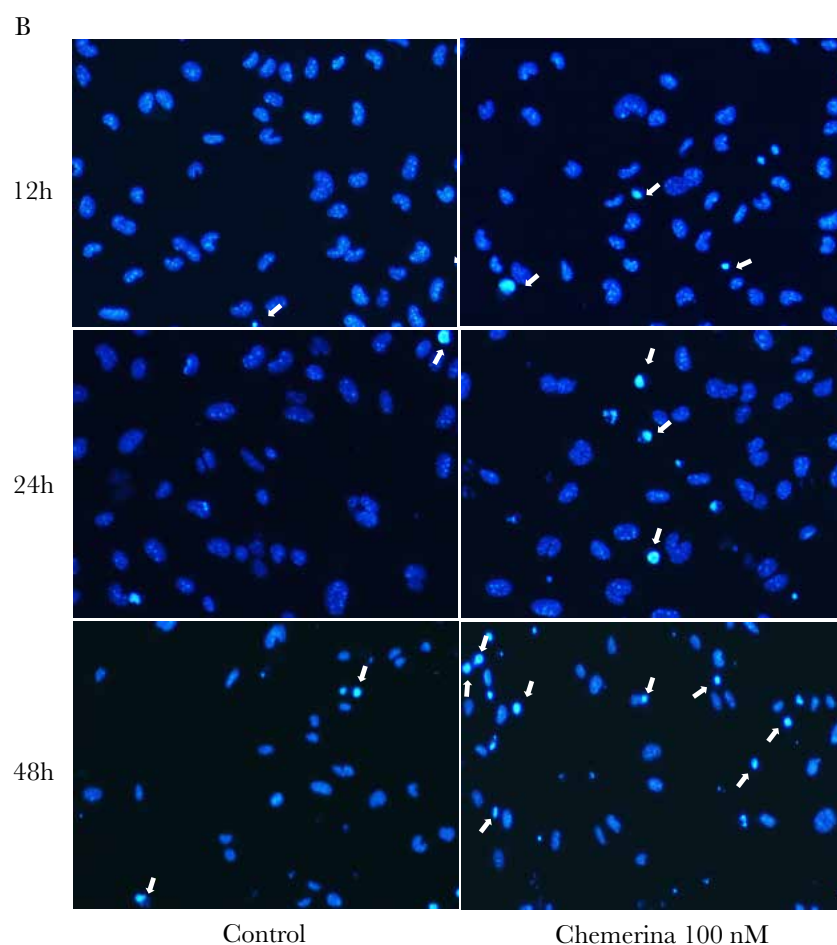


Figura 54: Los cardiomiocitos HL-1 fueron tratados con una dosis de chemerina de 100 nM a diferentes tiempos de 12, 24 y 48 horas y se analizó la apoptosis mediante la tinción vital de Hoechst. **A:** Resultados cuantitativos. **B:** Microfotografías (X400) de un experimento representativo del tratamiento con chemerina a 12, 24 y 48 horas (las flechas indican los núcleos con mayor intensidad de fluorescencia mostrando la fragmentación nuclear). Datos expresados como media \pm SEM, test estadístico de Mann Whitney. $**p<0.01$ respecto al control.

Se realizaron experimentos en cardiomiocitos neonatales de rata que confirmaron los efectos hallados en las células HL-1. Se demostró que el tratamiento con chemerina en un rango de dosis de 0.1 a 100 nM durante 48 horas incrementaba la apoptosis en los cardiomiocitos neonatales de rata de forma dosis dependiente. La apoptosis sufría un incremento, respecto a los controles, estadísticamente significativo a dosis de 10 ($8.15\pm 0.96\%$, $p<0.05$, $n=6$) y 100 nM ($9.70\pm 0.47\%$, $p<0.05$, $n=6$) (Figura 55).

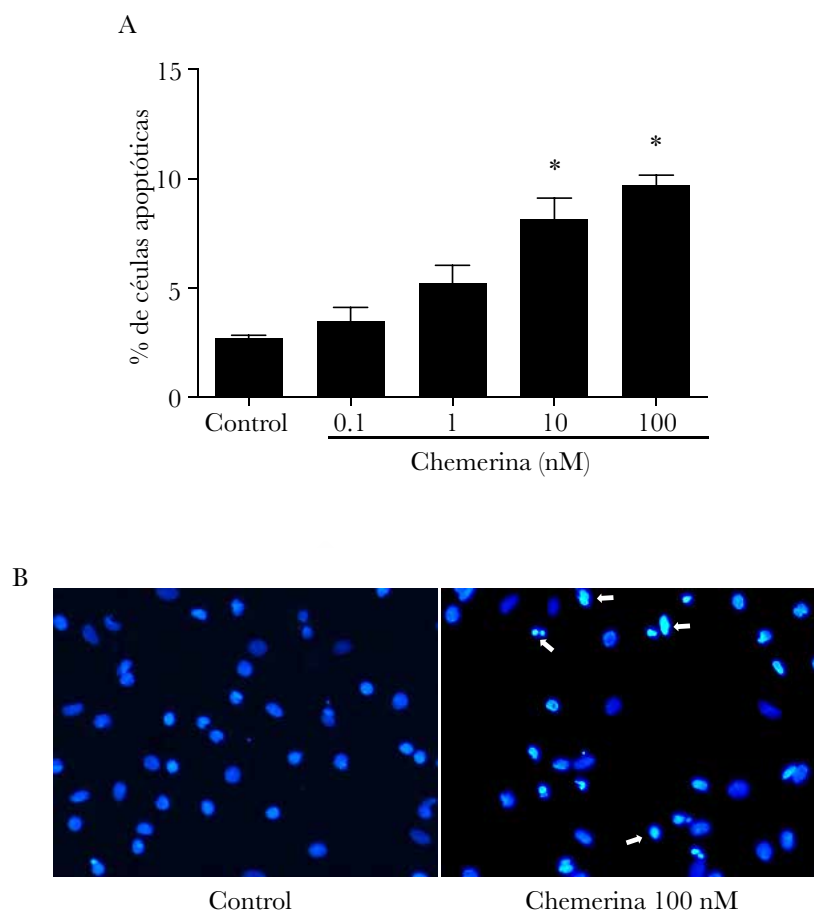


Figura 55: Análisis de la apoptosis mediante la tinción vital de Hoechst en cardiomiocitos neonatales de rata. **A:** Resultados cuantitativos del tratamiento durante 48 horas con un rango de dosis de chemerina de 0.1 a 100 nM que demostraron una inducción de la apoptosis dosis dependiente. **B:** Microfotografías (X400) de un experimento representativo (las flechas indican los núcleos con mayor intensidad de fluorescencia mostrando la fragmentación nuclear). Datos expresados como media \pm SEM, test estadístico de Mann Whitney. * $p < 0.05$ respecto al control.

2.2.- Ciclo celular

Se confirmó la inducción de apoptosis por la chemerina mediante la técnica de análisis del ciclo celular por citometría de flujo, tanto en la línea celular HL-1 como en cardiomiocitos neonatales de rata. Se demostró que el tratamiento con chemerina a una dosis de 100 nM durante 24 horas provocaba un aumento estadísticamente significativo en la apoptosis, con respecto a las células control (1.22 ± 0.10 , $p < 0.05$, $n=6$) (Figura 56).

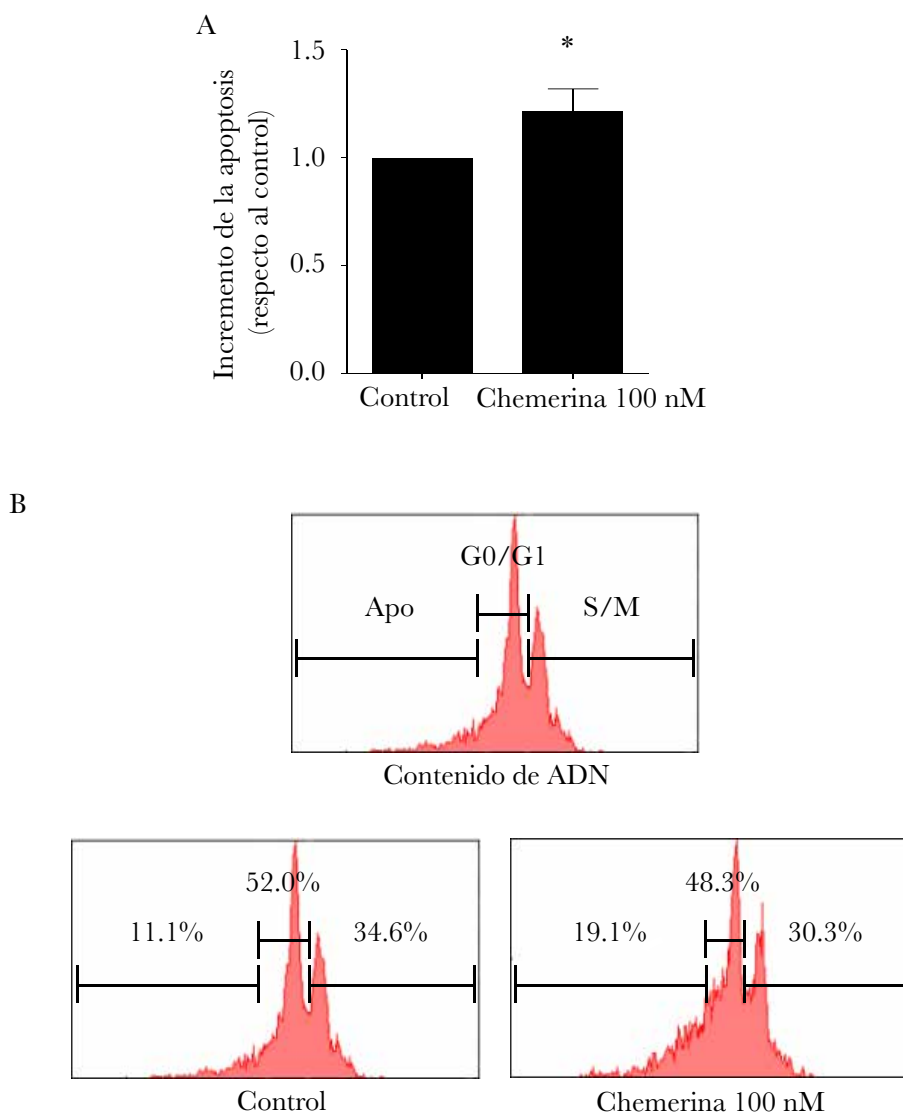


Figura 56: Resultado del tratamiento con chemerina en el ciclo celular de la línea de cardiomiocitos HL-1. Se confirmó, mediante la tinción con yoduro de propidio y el posterior análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo, la reducción en la viabilidad de las células HL-1 tratadas con chemerina a una dosis de 100 nM durante 24 horas (n=6). **A:** Resultados cuantitativos. **B:** Resultados de un experimento representativo que muestra el número de células frente a su contenido en ADN y los porcentajes de células que son apoptóticas (Apoc) o en las fases G₀/G₁ (2n) o S/M (4n). Datos expresados como media±SEM en unidades arbitrarias, test de los rangos con signo de Wilcoxon. **p*<0.05 respecto al control.

El análisis de ciclo del ciclo celular también confirmó resultados similares en la inducción de la apoptosis en cardiomiocitos neonatales de rata tratados con chemerina 100 nM durante 24 horas (1.72 ± 0.36 , *p*<0.05, n=6) (Figura 57).

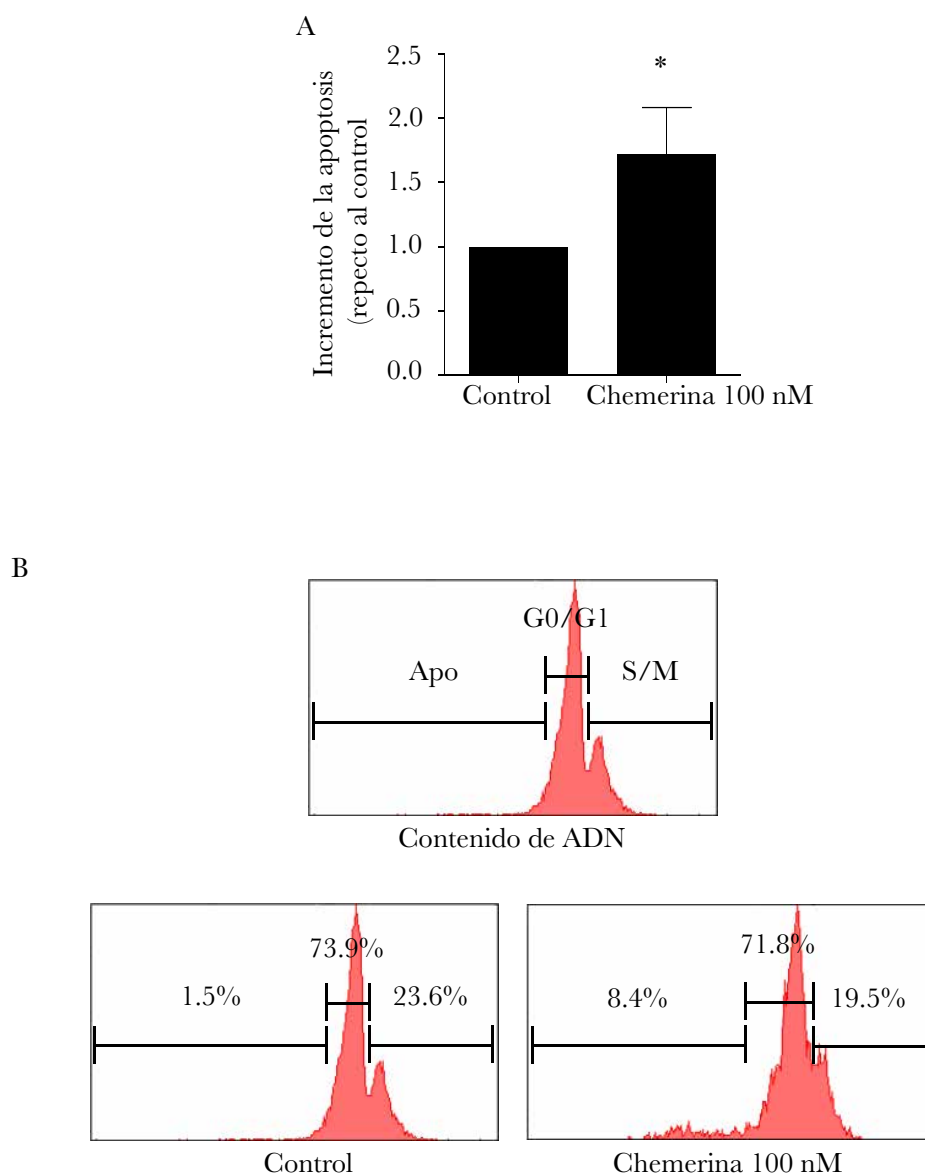


Figura 57: Resultados del efecto de la chemerina en el ciclo celular en cardiomiocitos neonatales de rata. Se confirmaron resultados similares en la reducción de la viabilidad celular mediante la tinción con yoduro de propidio y el posterior análisis del ciclo celular con citometría de flujo (n=6). **A:** Resultados cuantitativos. **B:** Resultados de un experimento representativo que muestra el número de células frente a su contenido en ADN y los porcentajes de células que son apoptóticas (Apo) o en las fases G₀/G₁ (2n) o S/M (4n). Datos expresados como media±SEM en unidades arbitrarias, test de los rangos con signo de Wilcoxon. **p*<0.05 respecto al control.

3.- Efecto de la chemerina sobre la captación de glucosa por cardiomiocitos murinos

El tratamiento de cardiomiocitos de la línea celular HL-1 con un rango de dosis de chemerina entre 1 y 100 nM durante 12 horas provocó un ligero descenso, aunque constante y significativo, en la captación de 2-deoxy-d- ^3H glucosa. La disminución en la captación de glucosa fue dosis dependiente con un efecto máximo con 100 nM de chemerina (0.88 ± 0.02 ; $p < 0.05$, $n=6$), con respecto al control. El tratamiento con insulina 100 nM durante 1 hora en ausencia de chemerina exógena provocó un aumento en la captación de 2-deoxy-d- ^3H glucosa (1.35 ± 0.10 ; $p < 0.05$, $n=6$) respecto al control (Figura 58).

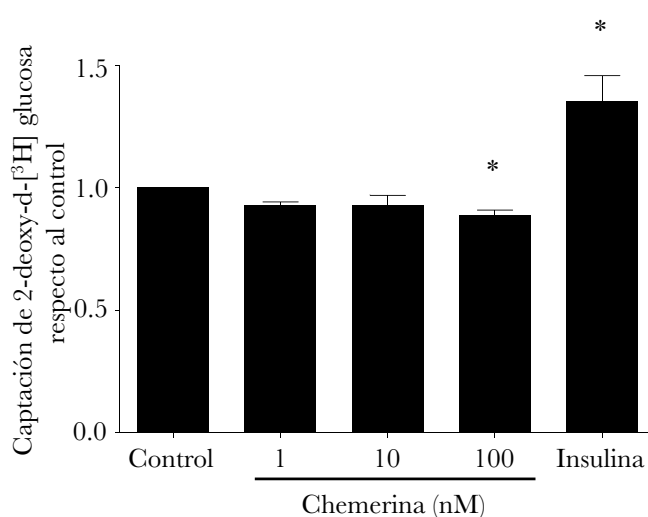


Figura 58: Captación de 2-deoxy-d- ^3H glucosa después de 12 horas de tratamiento con chemerina en un rango de dosis de 1-100 nM y después de 1 hora de tratamiento con insulina 100 nM en cardiomiocitos HL-1. Datos expresados como media \pm SEM en unidades arbitrarias, test de los rangos con signo de Wilcoxon. * $p < 0.05$ respecto al control.

4.- Efecto de la chemerina sobre la activación de AKT

AKT es una quinasa de vital importancia por sus implicaciones en vías de señalización relacionadas con la supervivencia celular, y desempeña un papel clave en múltiples procesos celulares como el metabolismo de la glucosa, la proliferación celular, la migración celular y la apoptosis.⁶²² Su activación se ha relacionado con una reducción en la muerte por apoptosis a nivel cardiomiocitario, mientras que un descenso en su actividad se ha relacionado con un mayor grado de apoptosis,⁶²³⁻⁶²⁵ por lo que se podría considerar la activación de AKT como un mecanismo cardioprotector en los cardiomiocitos. Nuestro objetivo ha sido estudiar si la apoptosis inducida por el tratamiento con chemerina podría estar relacionada con un descenso en la fosforilación de AKT en los cardiomiocitos. Se demostró que el tratamiento con chemerina en cardiomiocitos neonatales de rata, en un rango de dosis de 10 a 100 nM y a tiempos de 5 minutos y 24 horas, inducía un descenso en la fosforilación de AKT en Thr308 y sin cambios en la fosforilación a nivel de Ser473. El efecto máximo en la disminución de la fosforilación de AKT Thr308 se dio con el tratamiento de chemerina 100 nM durante 5 minutos, en comparación con los controles (0.63 ± 0.05 , $p < 0.05$, $n=6$) (Figura 59)

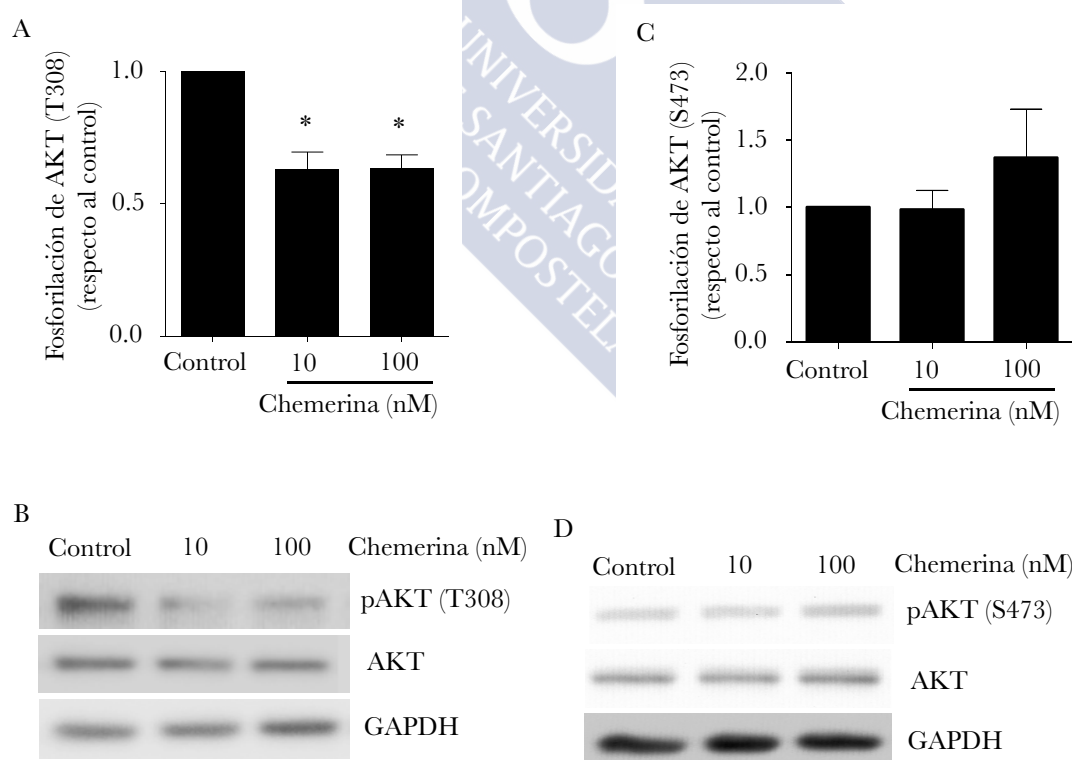


Figura 59: El tratamiento con chemerina durante 5 minutos disminuye la fosforilación de AKT en Thr308 sin afectar la fosforilación en Ser473 en cardiomiocitos neonatales de rata. Mediante Western blot se confirmó el descenso en la fosforilación en Thr308 ($n=6$) (A y B) y no se observaron cambios en la fosforilación a nivel de Ser473 ($n=7$) (C y D). Datos expresados como media \pm SEM en unidades arbitrarias, test de los rangos con signo de Wilcoxon. * $p < 0.05$ respecto al control.

El tratamiento con chemerina 100 nM durante 24 horas también mostraba una disminución estadísticamente significativa en la fosforilación de AKT en Thr308, con respecto a los controles (0.80 ± 0.02 , $p < 0.05$, $n=3$), la fosforilación de AKT en Ser473 tampoco estaba afectada por el tratamiento con chemerina durante de 24 horas (Figura 60).

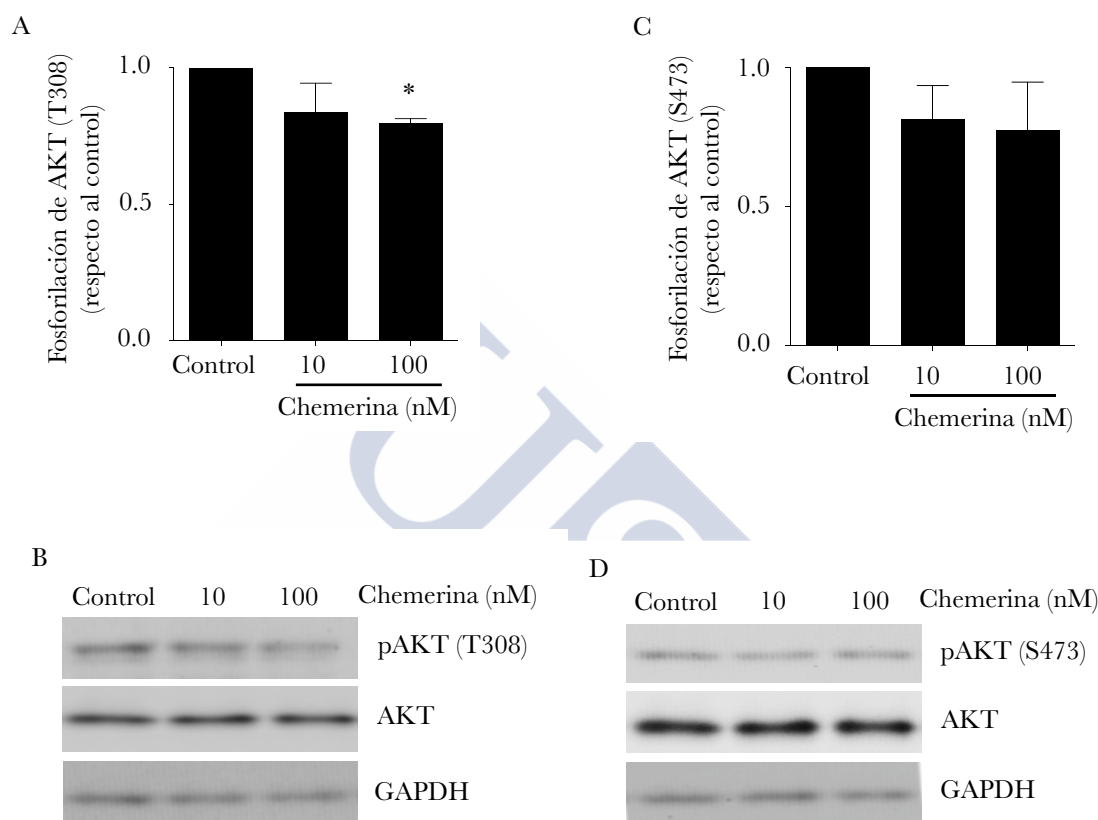


Figura 60: El tratamiento con chemerina 100 nM durante 24 horas mostraba una disminución en la fosforilación de AKT en Thr308 sin afectar la fosforilación en Ser473 en cardiomiocitos neonatales de rata. El Western blot mostraba un descenso en la fosforilación en Thr308 ($n=3$) (A y B) y no se evidenciaron cambios en la fosforilación a nivel de Ser473 ($n=3$) (C y D). Datos expresados como media \pm SEM en unidades arbitrarias, test estadístico t de Student. * $p < 0.05$ respecto al control.

Se realizaron los mismos tratamientos con chemerina en la línea celular de cardiomiocitos HL-1 y se obtuvieron resultados similares. Se demostró que el tratamiento con chemerina 100 nM durante 5 minutos provocaba un descenso estadísticamente significativo en los niveles de fosforilación de AKT en Thr308 con respecto al control (0.79 ± 0.05 , $p < 0.05$, $n=6$) y sin efectos en la fosforilación de Ser473 (Figura 61).

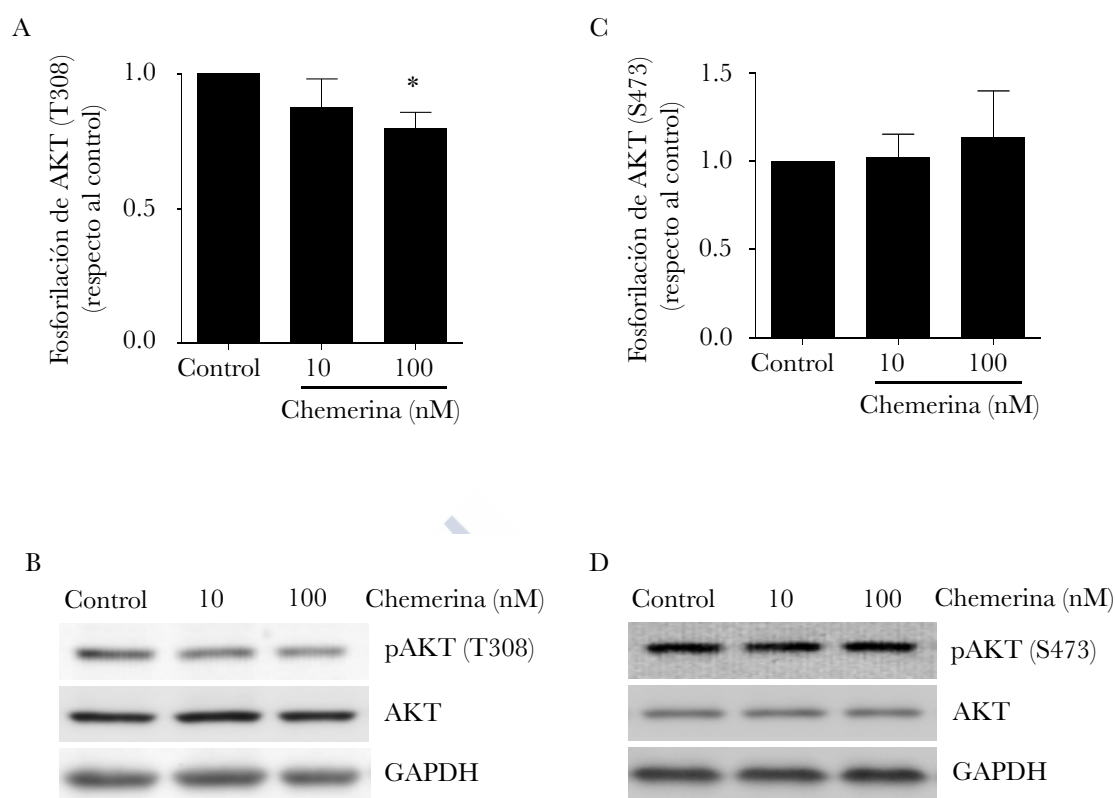


Figura 61: La chemerina reduce la fosforilación de AKT en Thr308 sin afectar la fosforilación de Ser473 en la línea celular de cardiomiocitos adultos HL-1. Mediante Western blot se observó que el tratamiento con chemerina 100 nM durante 5 minutos provocaba un descenso estadísticamente significativo en la fosforilación de AKT en Thr308 (A y B) ($n=6$), sin afectar a la fosforilación en Ser473 ($n=7$) (C y D). Datos expresados como media \pm SEM en unidades arbitrarias, test de los rangos con signo de Wilcoxon. * $p<0.05$ respecto al control.

Al igual que en los experimentos con cardiomiocitos neonatales de rata, el tratamiento con chemerina 100 nM durante 24 horas en los cardiomiocitos HL-1 también mostraba una disminución estadísticamente significativa en la fosforilación de AKT en Thr308, con respecto al control (0.57 ± 0.12 , $p<0.05$, $n=3$), pero sin cambios significativos en la fosforilación de AKT en Ser473 (Figura 62).

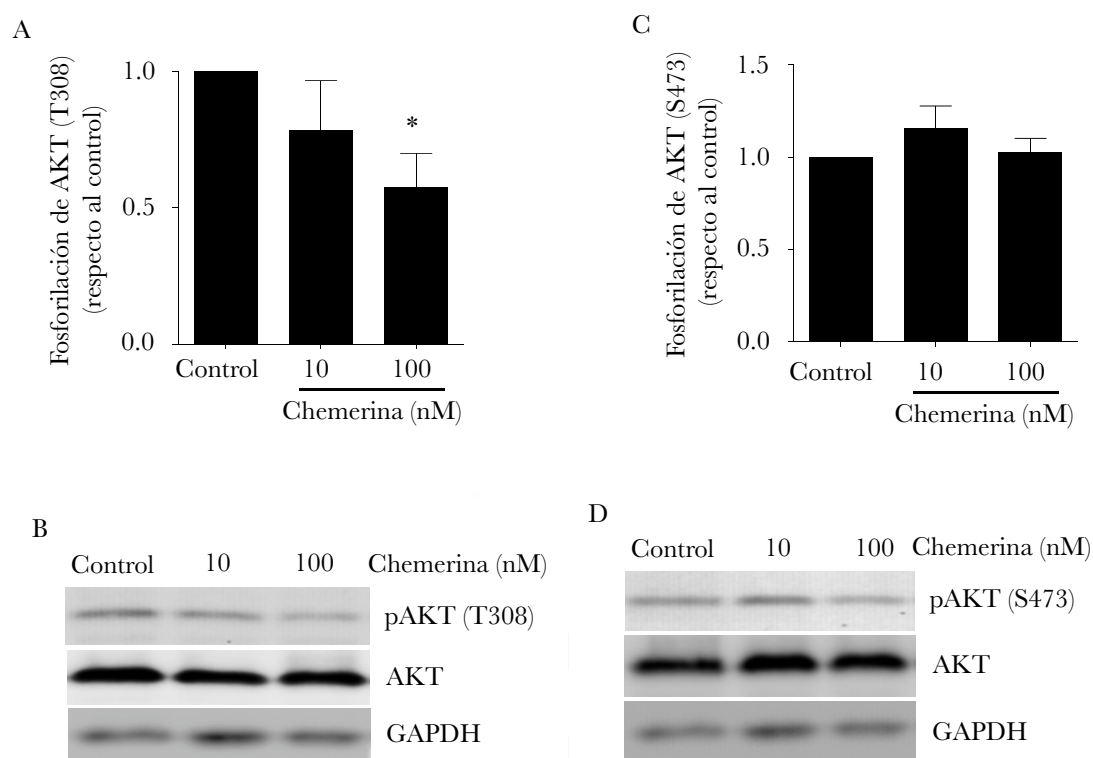


Figura 62: El tratamiento con chemerina 100 nM durante 24 horas mostraba una disminución en la fosforilación de AKT en Thr308 sin afectar la fosforilación en Ser473 en cardiomiocitos HL-1. El Western blot mostraba un descenso en la fosforilación en Thr308 (n=4) (A y B) y no se evidenciaron cambios en la fosforilación a nivel de Ser473 (n=4) (C y D). Datos expresados como media±SEM en unidades arbitrarias, test de los rangos con signo de Wilcoxon. * $p < 0.05$ respecto al control.

5.- Efecto de la chemerina sobre la activación de la caspasa-9 en cardiomiocitos

Trabajos previos han podido demostrar que la activación de AKT en cardiomiocitos tiene la capacidad de inhibir la activación de la caspasa-9 y, de esta forma, impedir la apoptosis y regular la supervivencia celular.⁶²⁶

Con el fin de comprobar si el descenso en la fosforilación de AKT provocado por el tratamiento con chemerina en cardiomiocitos podría estar afectando la actividad de la caspasa-9 y, por tanto, intervenir en la inducción de la apoptosis, se procedió a evaluar mediante Western blot la fragmentación de la caspasa-9 y su consecuente activación en cardiomiocitos tratados con chemerina. El tratamiento de cardiomiocitos de la línea HL-1 con chemerina a dosis de 10 y 100 nM durante 24 horas fue capaz de inducir la

activación de la caspasa-9 de forma dosis dependiente. Mediante Western blot se pudo observar que el tratamiento con chemerina provocaba un aumento en la activación de la caspasa-9 (en los fragmentos de 39 y 37 kDa). El tratamiento con la dosis de 100 nM de chemerina provocaba un aumento estadísticamente significativo en la caspasa-9 activada, con respecto al control (1.35 ± 0.10 , $p < 0.05$, $n=6$) (Figura 63).

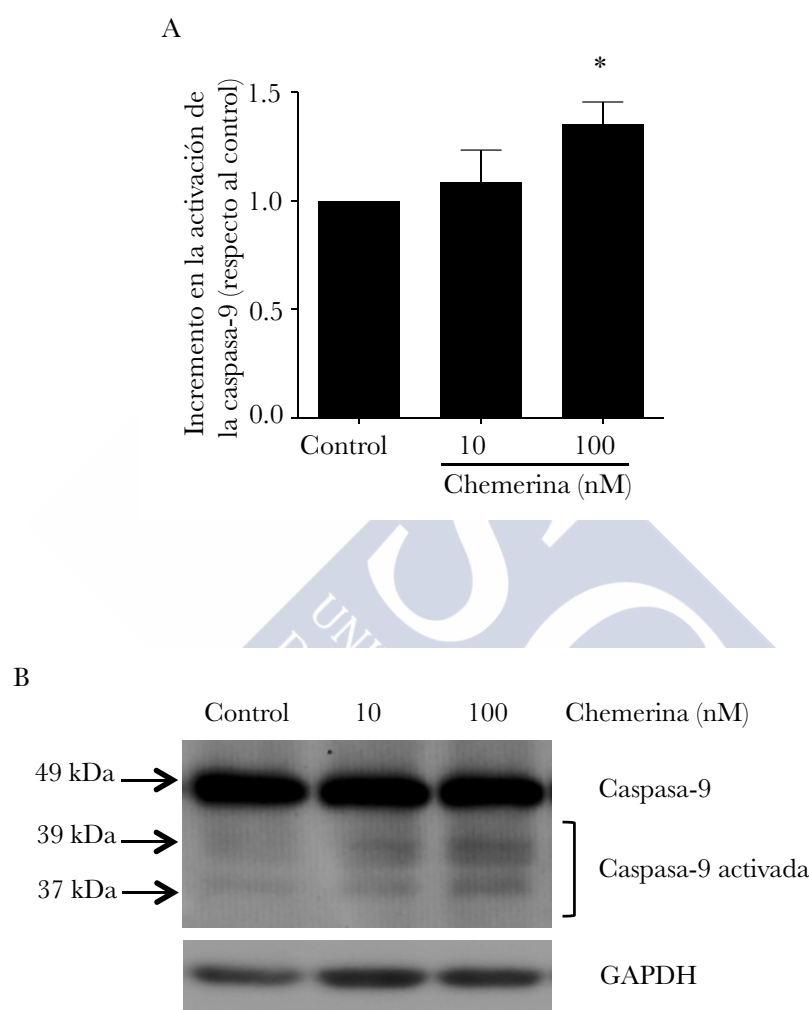


Figura 63: El tratamiento con chemerina estimula la escisión de la caspasa-9 en cardiomiocitos HL-1. **A:** La dosis de chemerina 100 nM durante 24 horas aumentaba la escisión de la caspasa-9 de forma estadísticamente significativa. **B:** El Western blot mostraba la activación de la caspasa-9 (en los fragmentos de 37 y 39 kDa) después del tratamiento con chemerina 10 y 100 nM durante 24 horas en cardiomiocitos HL-1 ($n=6$). Datos expresados como media \pm SEM en unidades arbitrarias, test de los rangos con signo de Wilcoxon. * $p < 0.05$ respecto al control.

6.- Regulación de los niveles de expresión de chemerina y CMKLR1 en cardiomiocitos neonatales de rata por la insulina

Hasta ahora hemos podido observar que la chemerina actúa como una molécula pro-apoptótica provocando una disminución en la fosforilación de AKT en cardiomiocitos. Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue investigar si la insulina podría afectar a la producción de chemerina en cardiomiocitos, puesto que la insulina ha demostrado en experimentos *in vitro* ser capaz de mejorar la supervivencia y prevenir la apoptosis mediante la activación de AKT en las células cardiacas.^{627,628} Se llevaron a cabo tratamientos en cardiomiocitos neonatales de rata con insulina en un rango de dosis de 0.1 a 100 nM durante 24 horas y se observó un descenso dosis dependiente en los niveles de ARNm de chemerina. El tratamiento con insulina provocaba un descenso estadísticamente significativo en los niveles de ARNm de chemerina a dosis de 10 (0.69 ± 0.11 , $p < 0.05$, $n=6$) y 100 nM (0.67 ± 0.10 , $p < 0.05$, $n=6$) respecto a los controles (Figura 64).

También se realizaron experimentos con insulina 100 nM en un rango de tiempo de 6 a 48 horas donde se observaba un descenso progresivo a lo largo del tiempo en los niveles de ARNm de chemerina, con un descenso estadísticamente significativo a las 48 horas, con respecto al control (0.63 ± 0.13 , $p < 0.05$, $n=5$) (Figura 64). Mediante Western blot se confirmaron los niveles de expresión de chemerina después del tratamiento de cardiomiocitos neonatales de rata con insulina 100 nM durante 24 horas. La insulina provocó un descenso en los niveles de proteína de chemerina estadísticamente significativo en relación al control (0.65 ± 0.07 ; $p < 0.01$, $n=6$) (Figura 64).

De forma adicional se determinó mediante ELISA que los cardiomiocitos neonatales de rata podían secretar chemerina al medio y que dicha secreción estaba influenciada por la insulina. El tratamiento con insulina 100 nM durante 48 horas provocaba un descenso significativo en las concentraciones de chemerina en el medio de cultivo (7.91 ± 1.32 pg/ml, $p < 0.05$, $n=4$) respecto a los controles (13.21 ± 0.59 pg/ml, $n=4$) (Figura 64).

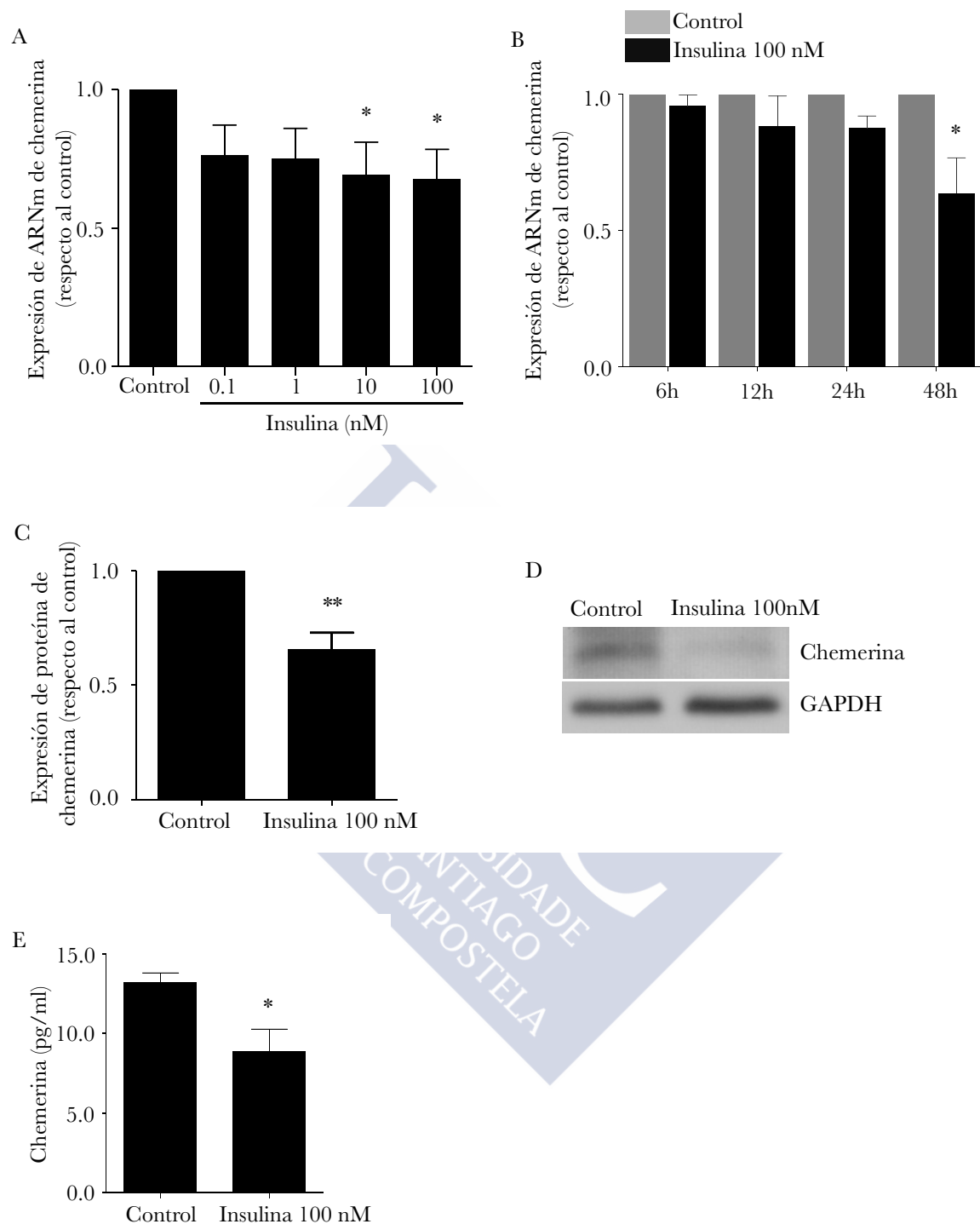


Figura 64: La insulina disminuye la producción de chemerina en cardiomiocitos neonatales de rata. **A:** El tratamiento con insulina en un rango de dosis de 0.1–100 nM durante 24 horas mostraba una reducción en los niveles de ARNm de chemerina. **B:** El tratamiento con insulina 100 nM a diferentes tiempos disminuía progresivamente la expresión de chemerina. **C y D:** Western blot confirmando el efecto de la insulina en los niveles de proteína de chemerina. **E:** Análisis mediante ELISA de los niveles de chemerina secretados por cardiomiocitos neonatales de rata, cultivados en medio libre de suero y después de 48 horas de tratamiento con insulina 100 nM. Datos expresados como media \pm SEM en unidades arbitrarias o pg/ml, test de los rangos con signo de Wilcoxon. * p <0.05; ** p <0.01 respecto al control.

Finalmente, se analizó si la insulina también podría influenciar los niveles de expresión del receptor CMKLR1. El tratamiento en cardiomiocitos neonatales de rata con insulina en un rango de dosis de 0.1 a 100 nM durante 24 horas provocaba un descenso progresivo en los niveles de ARNm de CMKLR1, con un descenso estadísticamente significativo con la dosis de insulina 100 nM, con respecto al control (0.69 ± 0.03 , $p < 0.01$, $n=6$) (Figura 65). El efecto del tratamiento con una dosis 100nM de insulina también provocaba un descenso a lo largo del tiempo en los niveles de ARNm de CMKLR1, que fue estadísticamente significativo a las 12 (0.70 ± 0.08 , $p < 0.001$, $n=5$), 24 (0.83 ± 0.07 , $p < 0.01$, $n=5$) y 48 (0.77 ± 0.09 , $p < 0.05$, $n=5$) horas con respecto al control (Figura 65). Por último, el Western blot confirmó el descenso de la expresión de CMKLR1 con respecto al control (0.62 ± 0.08 , $p < 0.01$, $n=6$), después de 24 horas de tratamiento de los cardiomiocitos con insulina 100 nM. (Figura 65).

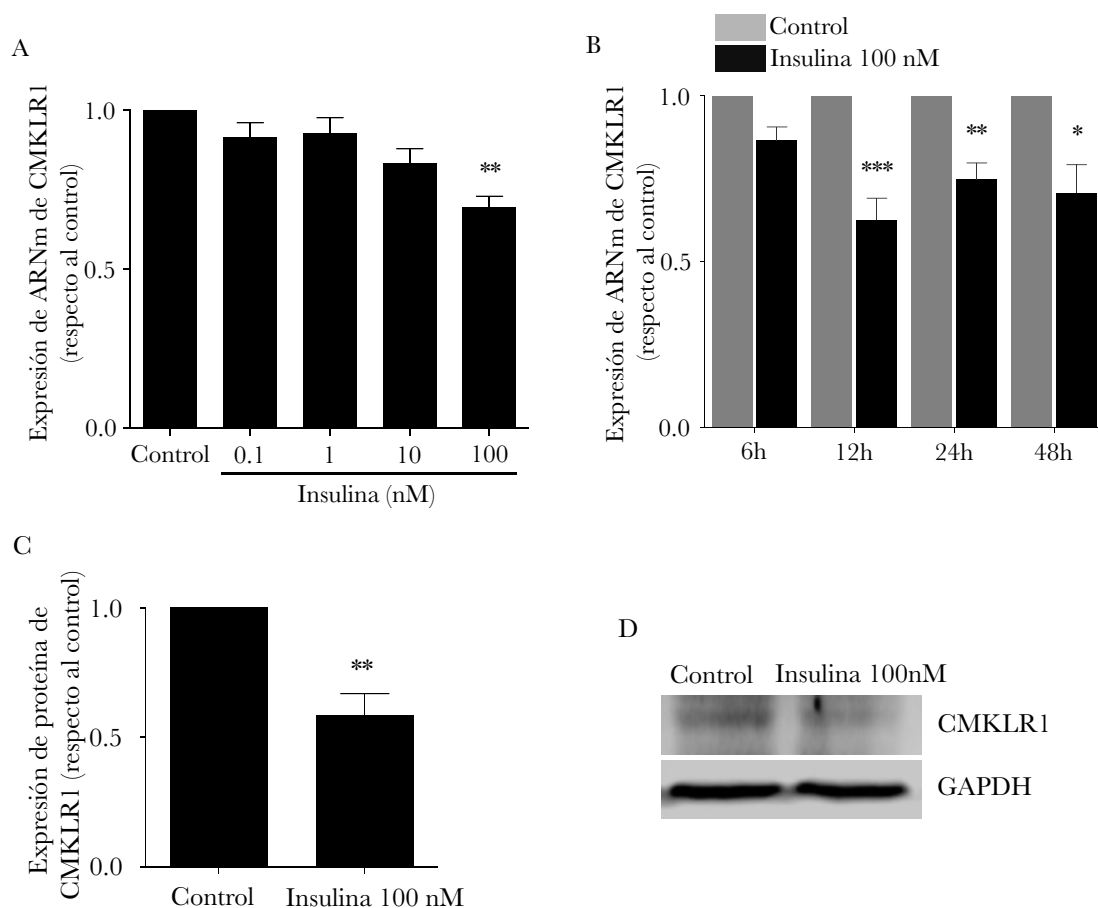


Figura 65: El tratamiento con insulina disminuye la expresión de CMKLR1 en cardiomiocitos neonatales de rata. **A:** La insulina provocaba un descenso en los niveles de ARNm de CMKLR1 a diferentes dosis a las 24 horas. **B:** El tratamiento con insulina 100 nM a diferentes tiempos disminuía la expresión de CMKLR1. **C y D:** Comprobación del efecto de la insulina en los niveles de proteína de CMKLR1. Datos expresados como media \pm SEM en unidades arbitrarias, test de los rangos con signo de Wilcoxon. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ respecto al control.

7.- Regulación de los niveles de expresión de chemerina y CMKLR1 en cardiomiocitos neonatales de rata por TNF- α

Numerosos trabajos han vinculado a la molécula proinflamatoria TNF- α con mecanismos fisiopatológicos en enfermedades cardiovasculares y, asimismo, se ha visto que tiene la capacidad de regular la sensibilidad a la insulina en diversos tipos celulares.⁶²⁹⁻⁶³¹ Además, el TNF- α también participa en los mecanismos implicados en la inducción a la apoptosis.⁶³² Debido a estos precedentes, nuestro objetivo ha sido el de investigar si el TNF- α podría estar implicado en la regulación de la producción de chemerina en cardiomiocitos.

Se llevaron a cabo tratamientos de cardiomiocitos neonatales de rata con TNF- α en un rango de dosis de 0.1 a 20 ng/ml durante 24 horas y se observaba un incremento dosis dependiente en los niveles de ARNm de chemerina, estadísticamente significativo a la dosis de 10 (2.31 ± 0.31 , $p < 0.01$, $n=6$) y con un efecto máximo a la dosis de 20 (2.53 ± 0.26 , $p < 0.001$, $n=6$) ng/ml, con respecto al control (Figura 66).

El tratamiento con 20 ng/ml de TNF- α también resultaba ser tiempo-dependiente, con un incremento progresivo de los niveles de chemerina, estadísticamente significativo a las 12 (5.42 ± 0.09 , $p < 0.05$, $n=5$), y 24 (2.23 ± 0.16 , $p < 0.01$, $n=5$) horas, y que alcanzaba un máximo a las 48 (5.42 ± 0.44 , $p < 0.001$, $n=5$) horas, con respecto al control (Figura 66).

El incremento en los niveles de chemerina se corroboró a nivel de proteína mediante Western blot después de un tratamiento con 20 ng/ml de TNF- α durante 24 horas (1.81 ± 0.29 , $p < 0.01$, $n=6$), respecto al control (Figura 66).

Finalmente, mediante ELISA se determinaron los niveles de secreción de chemerina en cardiomiocitos neonatales de rata. El tratamiento con 20 ng/ml de TNF- α durante 48 horas no provocaba ningún cambio significativo en los niveles de secreción de chemerina al medio, con respecto al control (Figura 66).

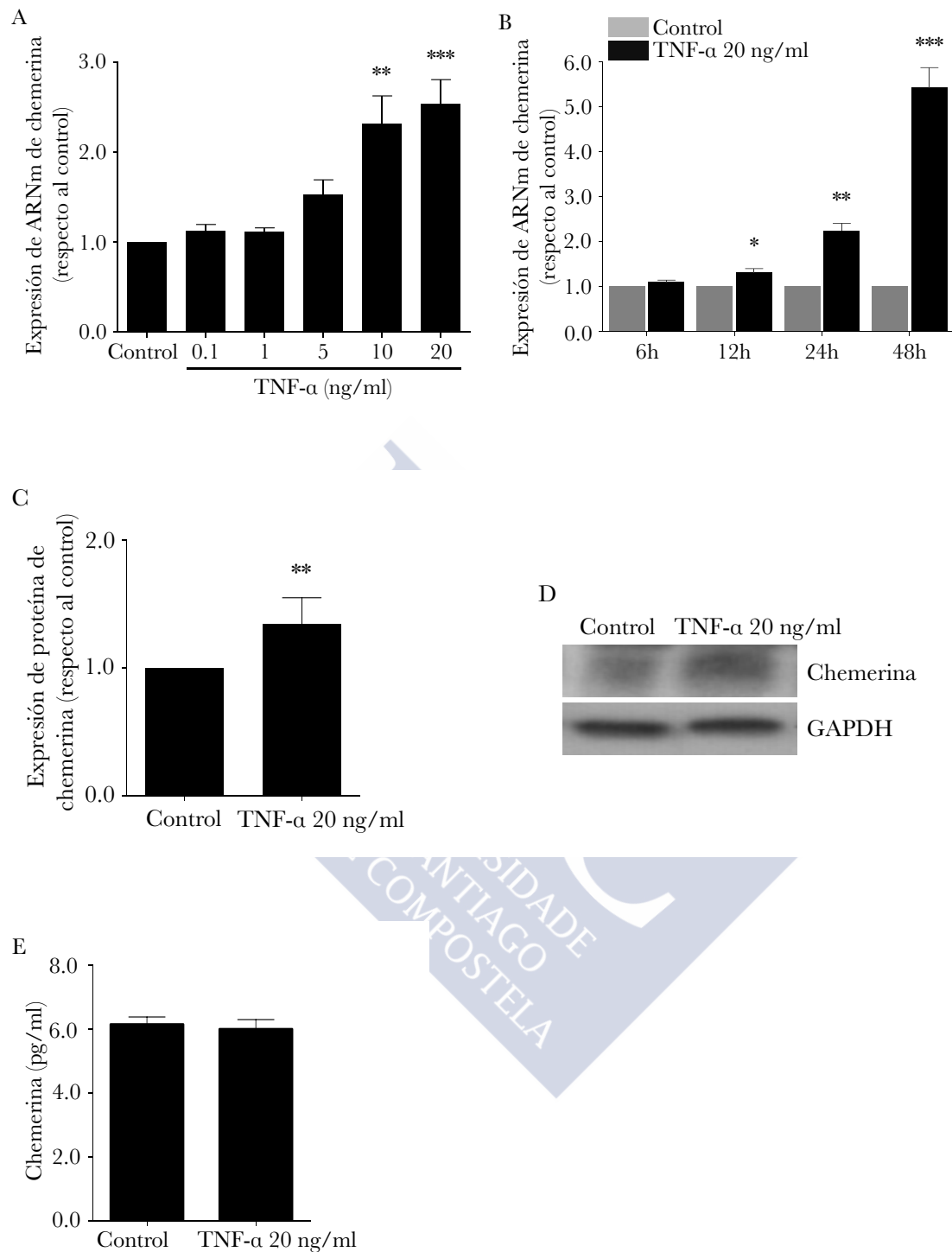


Figura 66: El TNF-α estimula la producción de chemerina en cardiomiocitos neonatales de rata. **A y B:** Los niveles de ARNm de chemerina fueron medidos mediante RT-qPCR después del tratamiento con TNF-α con un rango de dosis de 0.1 a 20 ng/ml durante 24 horas de tratamiento y también a diferentes tiempos con 20 ng/ml de TNF-α. **C y D:** Comprobación del efecto del TNF-α en los niveles de proteína de chemerina. **E:** Niveles de chemerina secretada determinados mediante ELISA en cardiomiocitos neonatales de rata, cultivados en medio libre de suero y después de 48 horas de tratamiento con 20 ng/ml de TNF-α. Datos expresados como media±SEM en unidades arbitrarias, test de los rangos con signo de Wilcoxon. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ respecto al control.

Se observó un efecto del TNF- α sobre la expresión de CMKLR1 opuesto al que ejercía sobre la chemerina en cardiomiocitos neonatales de rata. El tratamiento con TNF- α provocaba una disminución en los niveles de ARNm de CMKLR1 dosis-dependiente, con un efecto inhibitorio máximo y estadísticamente significativo con la dosis de 20 ng/ml después de 24 horas (0.55 ± 0.07 , $p < 0.01$, $n=6$) respecto al control (Figura 67).

El efecto del TNF- α sobre la expresión de CMKLR1 también era tiempo-dependiente y se observaba una reducción estadísticamente significativa en los niveles de ARNm a las 24 (0.35 ± 0.05 , $p < 0.04$, $n=5$) y 48 (0.37 ± 0.05 , $p < 0.05$, $n=5$) horas de tratamiento, con respecto al control (Figura 67). El tratamiento con 20 ng/ml de TNF- α durante 24 horas confirmaba un descenso significativo, en comparación con el control, en los niveles de proteína de CMKLR1 (0.75 ± 0.03 , $p < 0.05$, $n=6$) (Figura 67).

Finalmente, se trataron cardiomiocitos neonatales de rata con una dosis de 100 nM de chemerina durante un período de 48 horas y se pudo observar un descenso estadísticamente significativo en los niveles de ARNm de CMKLR1 (0.61 ± 0.07 , $p < 0.05$, $n=4$) con respecto al control (Figura 67), lo que sugiere que la inducción en la síntesis de chemerina provocada por el tratamiento con TNF- α podría, a su vez, mediar en el descenso en la expresión del receptor que hemos observado en estos experimentos.

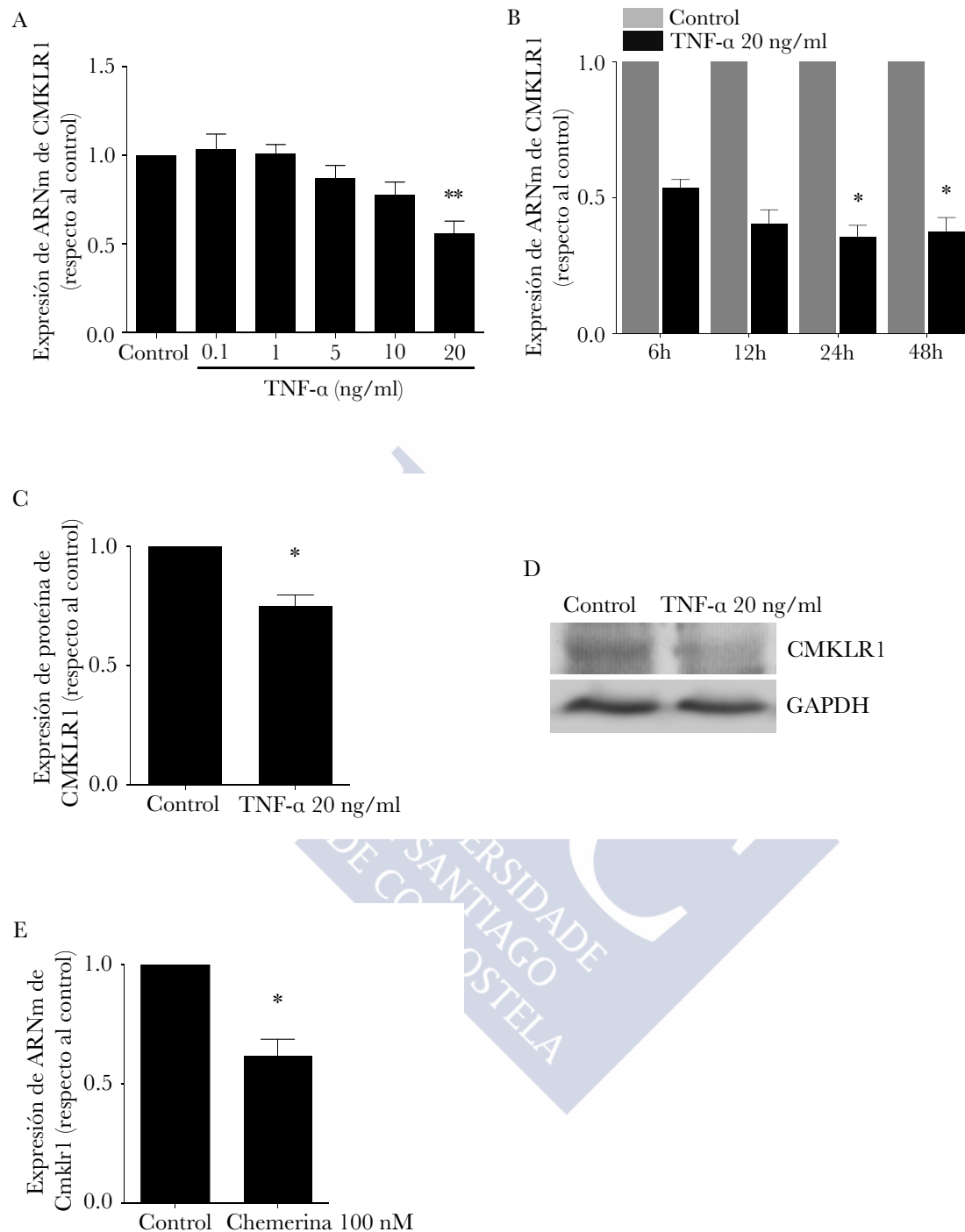


Figura 67: El TNF-α provoca una disminución en los niveles de expresión de CMKLR1 en cardiomiocitos neonatales de rata. **A:** El tratamiento con TNF-α en un rango de dosis de 0.1 a 20 ng/ml durante 24 horas provocaba una reducción de los niveles de ARNm de CMKLR1. **B:** El tratamiento con TNF-α 20 ng/ml a diferentes tiempos reducía progresivamente la expresión de CMKLR1. **C y D:** El Western blot confirmó el efecto del TNF-α en los niveles de proteína. **E:** El tratamiento con chemerina a una dosis de 100 nM durante 48 horas provocaba una disminución en los niveles de ARNm de CMKLR1. Datos expresados como media±SEM en unidades arbitrarias, test de los rangos con signo de Wilcoxon. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ respecto al control.



DISCUSIÓN

CHEMERINA



El tejido adiposo se ha consolidado como un órgano secretor y no solo un mero almacén de energía, desde que el grupo de Zhang en 1994 descubriera que dicho tejido secretaba la leptina, hormona que regula la ingesta y la homeostasis energética.⁶³³ Desde entonces, se han identificado un numeroso grupo de proteínas y sustancias con actividad biológica que comúnmente se denominan adipokinas y son sintetizadas tanto por los propios adipocitos como por otras células que componen el tejido adiposo.² Las adipokinas pueden actuar tanto a nivel local, de forma autocrina/paracrina, como a nivel sistémico con funciones endocrinas que regulan una amplia gama de procesos biológicos relacionados con la inflamación, la homeostasis metabólica y el sistema cardiovascular.^{417,440,634} Existen diversos estudios que han puesto de manifiesto que los niveles y producción de adipokinas se encuentran alterados en la obesidad.^{419,434} Las adipokinas han ido cobrando más importancia en los últimos años puesto que parecen ser el vínculo entre la obesidad, la inflamación, con los componentes del síndrome metabólico y, en última instancia, con diversas enfermedades cardiovasculares.^{87,414,433,635} Además, el estudio de esta familia creciente de adipokinas, puesto que se continúan descubriendo nuevas hormonas, se amplía e incrementa dado su implicación en diversas patologías a nivel sistémico y en la regulación de la función cardiovascular.^{231,622}

De igual modo, el corazón también ha pasado a considerarse actualmente como un órgano endocrino que, además de la producción de los péptidos natriuréticos, tiene la capacidad de producir un variado número de hormonas no solo con acciones directas en la regulación de la función cardiovascular, sino también con efectos sobre el metabolismo y el gasto energético.^{441,472,484,485,488}

Dadas las implicaciones de las adipokinas en las enfermedades cardiovasculares y la homeostasis energética, es primordial estudiar y entender el papel que pueden desempeñar en la viabilidad y el metabolismo cardiomiocitario en concreto y a nivel cardiaco en general, para intentar discernir y conocer mejor la fisiopatología de las enfermedades cardiometabólicas.^{87,472,483,484,636}

La chemerina y su receptor principal CMKLR1 se producen principalmente en el hígado y tejido adiposo, pero también se expresan en un amplio rango de otros tejidos, incluyendo el corazón, donde probablemente puede actuar como un modulador paracrino/autocrino^{499,637} y con una amplia variedad de funciones que incluyen la

regulación del metabolismo e inflamación.⁵³⁴ La chemerina, aunque en un principio identificada como una molécula quimiotáctica y moduladora del sistema inmune, es hoy en día considerada como una adipokina con efectos muy variados, y que se ha asociado tanto con procesos metabólicos como inflamatorios,⁶⁰⁵ con la adipogénesis,⁵¹¹ con la homeostasis energética⁵⁵⁶ y, de manera muy relevante, con las enfermedades cardiovasculares⁵⁴⁷, siendo por tanto considerada una hormona pleiotrópica.

La chemerina ha sido hallada en abundancia en fluidos⁴⁹⁰ y tejidos inflamados⁵⁹⁹ en humanos; y a día de hoy existen numerosos estudios y trabajos (tanto experimentales como clínicos) que dan fundamento al importante papel que parece jugar la chemerina tanto en la fisiología normal como en la fisiopatología de la inflamación y los trastornos metabólicos.⁶¹⁹ Hasta el momento se sabe que existe una relación entre la chemerina y las enfermedades cardiovasculares, esto se apoya en trabajos llevados a cabo en pacientes y cuyos resultados han demostrado que los niveles de ARNm y proteína de chemerina en el tejido adiposo epicárdico, se encuentran significativamente más elevados en pacientes con cardiopatía coronaria, y se correlacionan con la severidad de la aterosclerosis presente en las arterias coronarias y con marcadores de inflamación.⁶³⁸ Además, en nuevos estudios se ha confirmado que los niveles séricos de la chemerina se encuentran más elevados en pacientes con cardiopatía coronaria⁵⁸⁶ y, a su vez, se correlacionan con la severidad y extensión de la estenosis coronaria y con diversos parámetros cardiometabólicos e inflamatorios como la proteína C reactiva y la IL-6.^{589,639} Diversos estudios han sugerido que la chemerina podría estar involucrada en los procesos inflamatorios implicados en el desarrollo de la aterosclerosis,⁵⁹⁸ y se ha podido detectar la expresión de la chemerina y el receptor CMKLR1 en células de las paredes de la aorta y de las arterias coronarias en humanos, estando los niveles proteicos de ambos correlacionados positivamente con la severidad de la aterosclerosis, por lo que parece clara la relación de la chemerina con el sistema cardiovascular y las diversas patologías asociadas a este.⁵⁷⁶

En este trabajo de tesis doctoral utilizamos una aproximación traslacional con un sistema experimental en el que se confirma la expresión de la chemerina y su principal receptor CMKLR1 en tejido cardíaco en humano, rata y ratón. Aunque trabajos previos habían demostrado la expresión de la chemerina y CMKLR1 en corazón de humano y murinos, a día de hoy, solo el estudio llevado a cabo por Zhang y

colaboradores en 2014 demostró la expresión de la chemerina y su receptor en cardiomiocitos de rata.¹⁰⁰ Nuestro trabajo ha confirmado por primera vez la expresión de ARNm y proteína de chemerina y CMKLR en tejido auricular y ventricular de corazón humano, y confirma, a su vez, los resultados obtenidos por el grupo de Zhang en cardiomiocitos de rata, comprobando así que nuestro sistema experimental es apropiado para el consiguiente estudio del papel de la chemerina a nivel cardíaco.

Nuestro objetivo ha sido el de intentar esclarecer un posible papel de la chemerina en la regulación de la viabilidad y el metabolismo cardiomiocitario, dado que ambos procesos tienen especial relevancia en la fisiopatología de una amplia variedad de enfermedades cardíacas que incluyen la cardiopatía isquémica, infarto agudo de miocardio y la insuficiencia cardíaca congestiva.⁶⁴⁰⁻⁶⁴²

Cabe destacar que las concentraciones de chemerina utilizadas en nuestros experimentos son similares y están dentro del rango de concentraciones circulantes de chemerina, y son semejantes a las descritas y utilizadas en estudios *in vitro* previos.^{100,514,533,536,551,643-646}

El principal resultado de este estudio ha sido el hallazgo de que la chemerina es capaz de inducir apoptosis en cardiomiocitos en cultivo de forma dosis y tiempo dependiente. La pérdida de cardiomiocitos tiene consecuencias dramáticas a nivel cardíaco, puesto que la desregulación de las vías de señalización de muerte y supervivencia que acarrea la apoptosis a nivel cardiomiocitario es uno de los componentes causales no solo en el daño por lesión isquémica aguda, sino también en estados de insuficiencia cardíaca crónica; y contribuye además al remodelado cardíaco y al fallo contráctil.⁶⁴⁷⁻⁶⁵¹

La apoptosis tiene un papel decisivo en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca y existen estudios que han comprobado una tasa de apoptosis que va desde el 0.12% al 0.70% pacientes con insuficiencia cardíaca.^{652,653} Este pequeño grado de apoptosis ha sido considerado suficiente para causar insuficiencia cardíaca, e incluso con niveles muy bajos de apoptosis, del orden de 23 miocitos por cada 10^5 núcleos, el grupo de Wencker ha demostrado que es más que suficiente para inducir una miocardiopatía dilatada letal en ratones.⁶⁵⁴ Aunque la chemerina es una molécula con probados efectos proinflamatorios, hasta el momento solamente Kim y colaboradores en 2013

demonstraron sus efectos proapoptóticos en células de la granulosa de ovario de rata.⁶⁵⁵ No obstante, en algunos trabajos previos se ha confirmado que la chemerina puede reducir la proliferación de los fibroblastos sinoviales humanos sin afectar a su viabilidad,⁶⁵⁶ pero también existen estudios que demuestran que puede ejercer el efecto contrario, siendo capaz de promover la proliferación en miocitos C2C12,⁶⁵⁷ lo que podría sugerir que la chemerina ejerce efectos diferentes dependiendo del tipo celular o tejido.

AKT, también denominada proteína quinasa B (PKB) por su similitud con las proteínas quinasas A y C, es una serina/treonina proteína quinasa involucrada en la regulación de una amplia variedad de funciones celulares e implicada en el metabolismo, la captación de glucosa, la proliferación y la síntesis de proteínas, todo ello enfocado a la supervivencia celular.⁶⁵² Se considera que AKT ejerce generalmente un papel cardioprotector, puesto que existen numerosas evidencias que indican que la activación de AKT reduce la apoptosis de los cardiomiocitos en condiciones de isquemia-reperusión,⁶²⁵ estrés oxidativo⁶²⁷ e insuficiencia cardíaca provocada por sobrecarga de presión en ratón.⁶⁴⁹

Los sustratos de AKT ejercen una influencia decisiva en las funciones celulares del miocardio que van desde el crecimiento, la supervivencia y la proliferación celular hasta la captación de glucosa, la expresión de determinados genes y la comunicación entre células a través de factores autocrinos y paracrinos.⁶⁵⁸ En síntesis, a nivel del miocardio, la quinasa AKT es un importante mediador y regulador situado en mitad de diferentes vías de señalización como son las metabólicas, de proliferación, diferenciación y apoptosis.⁶⁵⁸

Estudios previos han relacionado la apoptosis con un descenso previo en los niveles de fosforilación de AKT en diferentes tipos celulares.^{659,660} Para su activación, AKT necesita ser fosforilado en el residuo Thr308 por la quinasa dependiente de fosfoinosítidos-1 o PDK1, lo que conlleva un aumento en la actividad de AKT de hasta 100 veces. Para su activación máxima, AKT necesita ser fosforilado de forma adicional en el residuo Ser473 por el complejo mTOR2 o mTORC2, lo que conduce a un aumento de hasta 10 veces más en la actividad de AKT.⁶⁵²

Para profundizar y aclarar los mecanismos y vías a través de los cuales la chemerina

puede inducir apoptosis a nivel cardiomiocitario, uno de los objetivos de esta tesis ha sido el de investigar si la apoptosis inducida por la chemerina podría estar mediada por alteraciones en la actividad de la quinasas AKT. Nuestros resultados muestran que la chemerina reduce la fosforilación de AKT en las células cardíacas en cultivo; además, el descenso en la actividad de AKT solo afecta a la fosforilación del residuo Thr308 y no tiene efectos significativos en la fosforilación del residuo Ser473.

Las diferencias encontradas en la fosforilación de AKT a nivel de Thr308 entre los cardiomiocitos HL-1 de ratón y los cardiomiocitos neonatales de rata podrían estar explicadas por el origen de los dos tipos celulares. Por un lado, los cardiomiocitos HL-1 son una línea celular tumoral derivada de cardiomiocitos atriales de ratón, sin embargo, los cardiomiocitos neonatales de rata provienen de una mezcla de cardiomiocitos de aurícula y ventrículo y derivan de un grupo heterogéneo de individuos de distinto género y progenitores. A pesar de la inherente heterogeneidad de los cardiomiocitos neonatales de rata, el descenso en la fosforilación de AKT a nivel de Thr308 inducida por el tratamiento con la chemerina 100 nM sigue siendo estadísticamente significativo a las 24 horas.

Los efectos de la chemerina en la fosforilación de AKT en otros tipos celulares se han investigado en numerosos trabajos. Se ha encontrado que la chemerina incrementa la fosforilación del residuo Ser473 en condrocitos humanos del cartílago articular, donde promueve la señalización inflamatoria,⁶⁶¹ y lo hace también en células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano, donde contribuye a la activación de la enzima sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), y por tanto incrementa los niveles de óxido nítrico a nivel del endotelio.^{583,602} Sin embargo, la chemerina también ha demostrado disminuir la fosforilación de AKT: en estudios *in vitro*, llevados a cabo en células humanas de músculo esquelético, se pudo comprobar que la chemerina provocaba una disminución significativa en la fosforilación de AKT en el residuo Thr308 y también en Ser473,⁶⁶² y en experimentos *in vivo* realizados en músculo esquelético de ratón se obtuvieron resultados similares,⁵⁰⁴ acarreado esta reducción en la fosforilación de AKT, en ambos casos, un incremento en la resistencia a la insulina.⁵⁵⁶

En estudios recientes, el equipo de Zhang¹⁰⁰ ha demostrado que la chemerina disminuye la captación de glucosa en cardiomiocitos neonatales de rata e induce

resistencia a la insulina, sugiriendo que este efecto podría estar mediado por la influencia negativa de la chemerina en la fosforilación de AKT.¹⁰⁰ En línea con estos resultados, otros autores han podido comprobar que el tratamiento con chemerina en músculo esquelético de ratón disminuye la fosforilación de AKT estimulada por la insulina, produciendo alteraciones en la función mitocondrial e incrementando el estrés oxidativo, con implicaciones a nivel de la regulación de la resistencia a la insulina.⁶⁴⁵ Además, estos efectos de la chemerina en la inducción de la disfunción mitocondrial en músculo esquelético de ratón se revirtieron al ser silenciada la expresión del receptor de la chemerina CMKLR1, lo que evidencia que la chemerina podría desempeñar un importante papel en la viabilidad celular y metabolismo del músculo esquelético a través de la regulación en la actividad de AKT.⁶⁴⁵

Aunque el trabajo de Kim y colaboradores de 2013,⁶⁵⁵ llevado a cabo en células de la granulosa en ovario de rata, sugiere que la inducción de la apoptosis por la chemerina está mediada por un aumento intracelular de factores proapoptóticos (PTEN y caspasa-3) y una disminución de los factores antiapoptóticos (PARP y AKT),⁶⁵⁵ nuestra hipótesis de que una reducción específica por parte de la chemerina en la fosforilación de AKT en Thr308 podría desempeñar un papel determinante en la inducción de la apoptosis, no solo está avalada por nuestros resultados, sino también por el hecho de que en estudios previos con células HEK293 se ha podido constatar que el inductor de apoptosis estauroesporina inhibe la fosforilación de AKT solamente a nivel de Thr308 sin afectar a Ser473.⁶⁶³ Nuestros resultados parecen ser consistentes con estos estudios. Sin embargo, a diferencia de la estauroesporina, en nuestro estudio la chemerina no parece afectar a la fosforilación de AMPK, ERK1/2 o p38 MAPK en cardiomiocitos murinos.

En la vía de señalización de AKT la caspasa-9 es una diana que media la apoptosis en cardiomiocitos.⁶⁵¹ Nuestros resultados muestran un incremento en la actividad de la caspasa-9 que sugiere su implicación directa en la apoptosis cardiomiocitaria inducida por chemerina.

La insulina es un reconocido factor protector a nivel del sistema cardiovascular y un activador de la vía de PI3K/AKT.⁶²⁸ En diversos estudios se ha confirmado que la insulina puede prevenir la apoptosis en cardiomiocitos, tanto inducida por el estrés

oxidativo⁶²⁷ como por daño a través de la hipoxia/reoxigenación,⁶⁶⁴ pero en ambos casos, a través de la activación de la vía de señalización de PI3K/AKT, de vital importancia para la supervivencia y la proliferación celular. En este estudio investigamos si la insulina podría afectar a la expresión de la chemerina (que ejerce un efecto proapoptótico en los cardiomiocitos, como previamente hemos confirmado) y de CMKLR1 en células cardíacas en cultivo. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con insulina en cardiomiocitos neonatales de rata produce un descenso en los niveles de ARNm y proteína tanto de chemerina como de CMKLR1, así como un descenso en la secreción de chemerina por los cardiomiocitos, lo que parece ser la primera evidencia de que la insulina puede actuar como un regulador negativo de la expresión génica de chemerina y CMKLR1. Adicionalmente, nuestros resultados podrían sugerir que la insulina y la chemerina podrían ejercer papeles antagónicos a nivel cardíaco, lo que podría tener una fuerte relación con los mecanismos involucrados en la resistencia a la insulina en cardiomiocitos, a la vista de los efectos negativos de la chemerina en la captación de glucosa que hemos observado y que también han sido confirmados en cardiomiocitos por el grupo de Zhang recientemente.¹⁰⁰ Sin embargo, existen estudios previos en los que se ha observado que la insulina puede incrementar los niveles de chemerina y su secreción en adipocitos humanos y murinos,^{507,665} lo que vuelve a poner de relieve que los efectos de la chemerina pueden ser dependientes del tejido o tipo celular.

El TNF- α es una citoquina proinflamatoria estrechamente relacionada con la fisiopatología de varias enfermedades cardiovasculares y que ejerce su acción a través del aumento de genes que controlan la inflamación, la proliferación y la apoptosis a nivel cardiomiocitario.⁹² En estudios previos se ha podido observar que otras adipokinas pueden modular el efecto del TNF- α , en particular, la leptina desempeña un papel crucial como regulador de la homeostasis energética que confiere protección frente a la apoptosis inducida por el TNF- α .⁶³² En vista de estos resultados, nuestro objetivo ha sido el de investigar si el tratamiento con TNF- α podría modular la síntesis de chemerina y CMKLR1 en cardiomiocitos. Previamente, diversos autores han constatado que el tratamiento con TNF- α incrementa los niveles de ARNm y proteína de la chemerina en adipocitos 3T3-L1,⁵¹⁴ aumenta los niveles séricos de chemerina en ratón,⁵¹⁴ eleva los niveles de ARNm de chemerina, pero no afecta a los de CMKLR1, en adipocitos derivados de tejido adiposo visceral de pacientes obesos,⁵⁹³ y aumenta la

expresión génica tanto de la chemerina como de CMKLR1 en células endoteliales humanas.⁵⁸⁴

Nuestros resultados muestran claramente que el tratamiento con TNF- α incrementa los niveles de expresión de chemerina pero provoca un descenso en los niveles de CMKLR1. Si tenemos en cuenta los estudios previos y nuestros resultados, parece claro que el efecto del TNF- α sobre la expresión de CMKLR1 depende del tipo celular en el que se examine. Además, el tratamiento con TNF- α no tuvo efectos sobre los niveles de chemerina secretada al medio por los cardiomiocitos. Esta divergencia en los cambios inducidos por el TNF- α en la expresión de ARNm y proteína de chemerina, podría ser debida a que el TNF- α tendría la capacidad de regular el proceso proteolítico extracelular que degradaría la chemerina secretada en péptidos más pequeños con actividad biológica y con la capacidad de unirse a CMKLR1, pero que no son detectados mediante la técnica de ELISA y, por otro lado, también podría deberse a que los altos niveles en la producción de chemerina, inducidos por el TNF- α , estarían actuando de forma intracrina en los cardiomiocitos.

El descenso de la expresión de CMKLR1 en los cardiomiocitos podría constituir un mecanismo de retroalimentación negativo que compensaría los elevados niveles intracelulares de chemerina inducidos por TNF- α , como hemos podido confirmar con el descenso de los niveles de ARNm de CMKLR1 después del tratamiento de los cardiomiocitos neonatales de rata con chemerina. Otros autores han podido constatar en condrocitos que la expresión de la chemerina puede ser regulada por factores implicados en diversos procesos inflamatorios, como la IL-1 β y el LPS.⁵⁰⁹ Se necesitan más estudios para aclarar la regulación de la chemerina y CMKLR1 a nivel cardiomiocitario y la posible relación entre el TNF- α y la chemerina en la inflamación a nivel cardíaco, la apoptosis en los cardiomiocitos y las enfermedades cardiovasculares, puesto que existen estudios que confirman una clara correlación de los niveles en suero de la chemerina con los niveles de TNF- α y otros componentes del síndrome metabólico y marcadores de inflamación como la proteína C reactiva y la IL-6.⁶⁰⁸ Además, diversos autores han demostrado que el TNF- α , el cual está implicado en diversas enfermedades cardiovasculares, tiene un papel directo en la mediación de la inflamación y la apoptosis en cardiomiocitos HL-1.^{93,666}

Todos los resultados presentados en este trabajo sugieren que la adipokina proinflamatoria chemerina podría tener efectos perjudiciales a nivel cardiaco, y que el sistema autocrino/paracrino de la chemerina a nivel cardiomiocitario está regulado por mediadores clave de la inflamación y el metabolismo.







CONCLUSIONES

CHEMERINA



- 1.- La chemerina y su receptor CMKLR1 se expresan en tejido cardiaco y en cardiomiocitos en cultivo de humano, rata y ratón.
- 2.- La chemerina tiene efectos perjudiciales en la viabilidad de los cardiomiocitos en cultivo, aumentando la apoptosis a través de la supresión parcial de la fosforilación de AKT y la posterior activación de la caspasa-9.
- 3.- La chemerina disminuye la captación de glucosa en cardiomiocitos en cultivo.
- 4.- Los niveles de expresión de la chemerina y CMKLR1 en las células cardiacas están regulados negativamente por la insulina.
- 5.- La molécula inflamatoria TNF- α regula positivamente la expresión de la chemerina y negativamente la de CMKLR1.







BIBLIOGRAFÍA



1. Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006;83(2):461S–465S.
2. Rega-Kaun G, Kaun C, Wojta J. More than a simple storage organ: adipose tissue as a source of adipokines involved in cardiovascular disease. *Thromb. Haemost.* 2013;110(4):641–50.
3. Ogston D, McAndrew GM. Fibrinolysis in obesity. *Lancet.* 1964;2(7371):1205–7.
4. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 2003;112(12):1785–8.
5. Gómez-Ambrosi J, Salvador J, Silva C, Pastor C, Rotellar F, Gil MJ, Cienfuegos JA, Frühbeck G. Increased cardiovascular risk markers in obesity are associated with body adiposity: role of leptin. *Thromb. Haemost.* 2006;95(6):991–6.
6. Hauner H. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proc. Nutr. Soc.* 2005;64(2):163–9.
7. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004;89(6):2548–2556.
8. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell.* 2014;156(1–2):20–44.
9. Blüher M. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 2009;117(6):241–50.
10. Nakamura K, Fuster JJ, Walsh K. Adipokines: A link between obesity and cardiovascular disease. *J. Cardiol.* 2014;63(4):250–259.
11. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: The new endocrine organ? a review article. *Dig. Dis. Sci.* 2009;54:1847–1856.
12. Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: An update. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 2006;64:355–365.
13. Gnacińska M, Małgorzewicz S, Guzek M, Lysiak-Szydłowska W, Sworczak K. Adipose tissue activity in relation to overweight or obesity. *Endokrynol. Pol.* 61(2):160–8.
14. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell.* 2007;131(2):242–256.
15. Bastien M, Poirier P, Lemieux I, Després J-P. Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity to Cardiovascular Disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2014;56(4):369–381.
16. Hu FB, Willett WC, Li T, Stampfer MJ, Colditz GA, Manson JE. Adiposity as compared with physical activity in predicting mortality among women. *N. Engl. J. Med.* 2004;351(26):2694–703.
17. Li TY, Rana JS, Manson JE, Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rexrode KM, Hu FB. Obesity as compared with physical activity in predicting risk of coronary heart disease in women. *Circulation.* 2006;113(4):499–506.

18. Stevens J, Cai J, Evenson KR, Thomas R. Fitness and fatness as predictors of mortality from all causes and from cardiovascular disease in men and women in the Lipid Research Clinics Study. *Am. J. Epidemiol.* 2002;156(9):832–841.
19. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, Eckel RH. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26(5):968–76.
20. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature.* 2006;444(7121):875–80.
21. Kaltman AJ, Goldring RM. Role of circulatory congestion in the cardiorespiratory failure of obesity. *Am. J. Med.* 1976;60(5):645–53.
22. Messerli FH, Nunez BD, Ventura HO, Snyder DW. Overweight and sudden death. Increased ventricular ectopy in cardiopathy of obesity. *Arch. Intern. Med.* 1987;147(10):1725–8.
23. Landsberg L, Aronne LJ, Beilin LJ, Burke V, Igel LI, Lloyd-Jones D, Sowers J. Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment--a position paper of the The Obesity Society and The American Society of Hypertension. *Obesity (Silver Spring).* 2013;21(1):8–24.
24. Jordan J, Yumuk V, Schlaich M, Nilsson PM, Zahorska-Markiewicz B, Grassi G, Schmieder RE, Engeli S, Finer N. Joint statement of the European Association for the Study of Obesity and the European Society of Hypertension: obesity and difficult to treat arterial hypertension. *J. Hypertens.* 2012;30(6):1047–55.
25. Peterson LR, Herrero P, Schechtman KB, Racette SB, Waggoner AD, Kisrieva-Ware Z, Dence C, Klein S, Marsala J, Meyer T, Gropler RJ. Effect of obesity and insulin resistance on myocardial substrate metabolism and efficiency in young women. *Circulation.* 2004;109(18):2191–6.
26. Szczepaniak LS, Dobbins RL, Metzger GJ, Sartoni-D'Ambrosia G, Arbique D, Vongpatanasin W, Unger R, Victor RG. Myocardial triglycerides and systolic function in humans: in vivo evaluation by localized proton spectroscopy and cardiac imaging. *Magn. Reson. Med.* 2003;49(3):417–23.
27. Sun X, Pan H, Tan H, Yu Y. High free fatty acids level related with cardiac dysfunction in obese rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2012;95(2):251–9.
28. Boudina S, Sena S, O'Neill BT, Tathireddy P, Young ME, Abel ED. Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation.* 2005;112(17):2686–95.
29. Takatsu M, Nakashima C, Takahashi K, Murase T, Hattori T, Ito H, Murohara T, Nagata K. Calorie restriction attenuates cardiac remodeling and diastolic dysfunction in a rat model of metabolic syndrome. *Hypertension.* 2013;62(5):957–65.
30. Grapsa J, Tan TC, Paschou SA, Kalogeropoulos AS, Shimony A, Kaier T, Demir OM, Mikhail S, Hakky S, Purkayastha S, Ahmed AR, Cousins J, Nihoyannopoulos P. The effect of bariatric surgery on echocardiographic indices: a review of the literature. *Eur. J. Clin. Invest.* 2013;43(11):1224–30.
31. Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T. The concept of metabolic syndrome:

- contribution of visceral fat accumulation and its molecular mechanism. *J. Atheroscler. Thromb.* 2011;18(8):629–639.
32. Shin J-A, Lee J-H, Lim S-Y, Ha H-S, Kwon H-S, Park Y-M, Lee W-C, Kang M-I, Yim H-W, Yoon K-H, Son H-Y. Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretations and usefulness. *J. Diabetes Investig.* 2013;4(4):334–343.
 33. Aykan AÇ, Gül İ, Kalaycıoğlu E, Gökdeniz T, Hatem E, Menteşe Ü, Yıldız BŞ, Yıldız M. Is metabolic syndrome related with coronary artery disease severity and complexity: An observational study about IDF and AHA/NHLBI metabolic syndrome definitions. *Cardiol. J.* 2014;21(3):245–251.
 34. Weiss R, Bremer AA, Lustig RH. What is metabolic syndrome, and why are children getting it? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2013;1281(1):123–140.
 35. Bruce KD, Byrne CD. The metabolic syndrome: common origins of a multifactorial disorder. *Postgrad. Med. J.* 2009;85(1009):614–621.
 36. Alberti KGM, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *Lancet.* 2005;366(9491):1059–1062.
 37. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes. Rev.* 2010;11(1):11–8.
 38. Karastergiou K, Fried SK. Multiple Adipose Depots Increase Cardiovascular Risk via Local and Systemic Effects. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2013;15(10):361.
 39. Gómez-Hernández A, Perdomo L, Escribano Ó, Benito M. Role of white adipose tissue in vascular complications due to obesity. *Clínica e Investig. en Arterioscler. publicación Of. la Soc. Española Arterioscler.* 2013;25(1):27–35.
 40. Yáñez M, Albala C. Body fat distribution: anthropometric indicators. *Rev. médica Chile.* 1995;123(12):1520–1524.
 41. Lakka H. Abdominal obesity is associated with increased risk of acute coronary events in men. *Eur. Heart J.* 2002;23(9):706–713.
 42. Despres J-P. Body Fat Distribution and Risk of Cardiovascular Disease: An Update. *Circulation.* 2012;126(10):1301–1313.
 43. Ebbert J, Jensen M. Fat Depots, Free Fatty Acids, and Dyslipidemia. *Nutrients.* 2013;5(2):498–508.
 44. González-Juanatey JR, Paz FL, Eiras S, Teijeira-Fernández E. Adipokines as novel cardiovascular disease markers. Pathological and clinical considerations. *Rev. española Cardiol.* 2009;62 Suppl 2:9–16.
 45. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral Fat Adipokine Secretion Is Associated With Systemic Inflammation in Obese Humans. *Diabetes.* 2007;56(4):1010–1013.
 46. Van de Voorde J, Pauwels B, Boydens C, Decaluwé K. Adipocytokines in relation to cardiovascular disease. *Metabolism.* 2013;62(11):1513–21.

47. Wajchenberg BL, Nery M, Cunha MR, Silva MER da. Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 2009;53(2):145–150.
48. Wajchenberg BL. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. *Endocr. Rev.* 2000;21(6):697–738.
49. Mocan Hognogi LD, Simiti LV. THE CARDIOVASCULAR IMPACT OF VISFATIN - AN INFLAMMATION PREDICTOR BIOMARKER IN METABOLIC SYNDROME. *Chujul Med.* 2016;89(3):322.
50. Anfossi G, Russo I, Doronzo G, Pomero A, Trovati M. Adipocytokines in Atherothrombosis: Focus on Platelets and Vascular Smooth Muscle Cells. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:1–26.
51. Russo I, Del Mese P, Doronzo G, Mattiello L, Viretto M, Bosia A, Anfossi G, Trovati M. Resistance to the Nitric Oxide/Cyclic Guanosine 5'-Monophosphate/Protein Kinase G Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells from the Obese Zucker Rat, a Classical Animal Model of Insulin Resistance: Role of Oxidative Stress. *Endocrinology.* 2008;149(4):1480–1489.
52. Taegtmeyer H. Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications. *Curr. Probl. Cardiol.* 1994;19(2):59–113.
53. Kolwicz SC, Purohit S, Tian R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ. Res.* 2013;113(5):603–16.
54. Neely JR, Morgan HE. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 1974;36:413–59.
55. Schwarz K, Siddiqi N, Singh S, Neil CJ, Dawson DK, Frenneaux MP. The breathing heart - mitochondrial respiratory chain dysfunction in cardiac disease. *Int. J. Cardiol.* 2014;171(2):134–43.
56. Kantor PF, Robertson MA, Coe JY, Lopaschuk GD. Volume overload hypertrophy of the newborn heart slows the maturation of enzymes involved in the regulation of fatty acid metabolism. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1999;33(6):1724–34.
57. Horowitz JD, Chirkov YY, Kennedy JA, Sverdlov AL. Modulation of myocardial metabolism: an emerging therapeutic principle. *Curr. Opin. Cardiol.* 2010;25(4):329–34.
58. Doenst T, Nguyen TD, Abel ED. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ. Res.* 2013;113(6):709–24.
59. Iliadis F, Kadoglou N, Didangelos T. Insulin and the heart. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2011;93 Suppl 1:S86-91.
60. Goodwin GW, Taegtmeyer H. Improved energy homeostasis of the heart in the metabolic state of exercise. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000;279(4):H1490-501.
61. Wentz AE, d'Avignon DA, Weber ML, Cotter DG, Doherty JM, Kerns R, Nagarajan R, Reddy N, Sambandam N, Crawford PA. Adaptation of myocardial substrate metabolism to a ketogenic nutrient environment. *J. Biol. Chem.* 2010;285(32):24447–56.

62. Goldberg IJ, Trent CM, Schulze PC. Lipid metabolism and toxicity in the heart. *Cell Metab.* 2012;15(6):805–12.
63. Stride N, Larsen S, Hey-Mogensen M, Sander K, Lund JT, Gustafsson F, Køber L, Dela F. Decreased mitochondrial oxidative phosphorylation capacity in the human heart with left ventricular systolic dysfunction. *Eur. J. Heart Fail.* 2013;15(2):150–7.
64. Bishop SP, Altschuld RA. Increased glycolytic metabolism in cardiac hypertrophy and congestive failure. *Am. J. Physiol.* 1970;218(1):153–9.
65. Lionetti V, Stanley WC, Recchia F a. Modulating fatty acid oxidation in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 2011;90(2):202–209.
66. Coggins M, Rosenzweig A. The Fire Within: Cardiac Inflammatory Signaling in Health and Disease. *Circ. Res.* 2012;110(1):116–125.
67. Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple Facets of NF- B in the Heart: To Be or Not to NF- B. *Circ. Res.* 2011;108(9):1122–1132.
68. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444(7121):860–867.
69. Ko HJ, Zhang Z, Jung DY, Jun JY, Ma Z, Jones KE, Chan SY, Kim JK. Nutrient Stress Activates Inflammation and Reduces Glucose Metabolism by Suppressing AMP-Activated Protein Kinase in the Heart. *Diabetes.* 2009;58(11):2536–2546.
70. Paulis L, Foulquier S, Namsolleck P, Recarti C, Steckelings UM, Unger T. Combined Angiotensin Receptor Modulation in the Management of Cardio-Metabolic Disorders. *Drugs.* 2016;76(1):1–12.
71. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* 2005;115(5):1111–1119.
72. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: Depot difference and regulation by glucocorticoid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998;83(3):847–850.
73. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA.* 1999;282(22):2131–2135.
74. Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R, Giugliano D. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *Jama.* 2003;289(14):1799–1804.
75. Julius S, Gudbrandsson T, Jamerson K. The hemodynamic link between insulin resistance and hypertension. *J. Hypertens.* 1991;9(9):983–986.
76. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* 2000;52(3):415–472.
77. Katovich MJ, Pachori A. Effects of inhibition of the renin-angiotensin system on the cardiovascular actions of insulin. *Diabetes, Obes. Metab.* 2000;2(1):3–14.
78. Shiuchi T, Iwai M, Li HS, Wu L, Min LJ, Li JM, Okumura M, Cui TX, Horiuchi M. Angiotensin II Type-1 Receptor Blocker Valsartan Enhances Insulin Sensitivity in

- Skeletal Muscles of Diabetic Mice. *Hypertension*. 2004;43(5):1003–1010.
79. Dagenais NJ, Jamali F. Protective effects of angiotensin II interruption: Evidence for antiinflammatory actions. *Pharmacotherapy*. 2005;25(9):1213–1229.
 80. Phillips MI, Kagiya S. Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator. *Curr. Opin. Investig. Drugs*. 2002;3(4):569–577.
 81. Ma L-J, Corsa BA, Zhou J, Yang H, Li H, Tang Y-W, Babaev VR, Major AS, Linton MF, Fazio S, Hunley TE, Kon V, Fogo AB. Angiotensin type 1 receptor modulates macrophage polarization and renal injury in obesity. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2011;300(5):F1203–F1213.
 82. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol*. 2011;11(2):85–97.
 83. Boddu NJ, Theus S, Luo S, Wei JY, Ranganathan G. Is the lack of adiponectin associated with increased ER/SR stress and inflammation in the heart? *Adipocyte*. 2014;3(1):10–18.
 84. Qi G-M, Jia L-X, Li Y-L, Li H-H, Du J. Adiponectin Suppresses Angiotensin II-Induced Inflammation and Cardiac Fibrosis through Activation of Macrophage Autophagy. *Endocrinology*. 2014;155(6):2254–2265.
 85. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin, an Adipocyte-Derived Plasma Protein, Inhibits Endothelial NF- κ B Signaling Through a cAMP-Dependent Pathway. *Circulation*. 2000;102(11):1296–1301.
 86. Chun HJ, Ali ZA, Kojima Y, Kundu RK, Sheikh AY, Agrawal R, Zheng L, Leeper NJ, Pearl NE, Patterson AJ, Anderson JP, Tsao PS, Lenardo MJ, Ashley EA, Quertermous T. Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis. *J. Clin. Invest*. 2008;118(10):3343–54.
 87. Mattu HS, Randeve HS. Role of adipokines in cardiovascular disease. *J. Endocrinol*. 2013;216(1):T17–36.
 88. Huang C-X, Yuan M-J, Huang H, Wu G, Liu Y, Yu S-B, Li H-T, Wang T. Ghrelin inhibits post-infarct myocardial remodeling and improves cardiac function through anti-inflammation effect. *Peptides*. 2009;30(12):2286–91.
 89. Cao Y, Tang J, Yang T, Ma H, Yi D, Gu C, Yu S. Cardioprotective Effect of Ghrelin in Cardiopulmonary Bypass Involves a Reduction in Inflammatory Response. Gallyas F, ed. *PLoS One*. 2013;8(1):e55021.
 90. Mao Y, Tokudome T, Kishimoto I, Otani K, Nishimura H, Yamaguchi O, Otsu K, Miyazato M, Kangawa K. Endogenous Ghrelin Attenuates Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy via a Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway. *Hypertension*. 2015;65(6):1238–1244.
 91. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *J Clin Invest*. 1994;94(4):1543–1549.

92. Moe KT, Khairunnisa K, Yin NO, Chin-Dusting J, Wong P, Wong MC. Tumor necrosis factor- α -induced nuclear factor-kappaB activation in human cardiomyocytes is mediated by NADPH oxidase. *J. Physiol. Biochem.* 2014;70(3):769–779.
93. Bajaj G, Sharma RK. TNF-alpha-mediated cardiomyocyte apoptosis involves caspase-12 and calpain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;345(4):1558–1564.
94. Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNFalpha in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. *Pharmacol. Ther.* 2010;127(3):295–314.
95. Ohta H, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwamoto N, Fujii H, Saito K, Sekikawa K, Seishima M. Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2005;180(1):11–17.
96. Xiao N, Yin M, Zhang L, Qu X, Du H, Sun X, Mao L, Ren G, Zhang C, Geng Y, An L, Pan J. Tumor necrosis factor-alpha deficiency retards early fatty-streak lesion by influencing the expression of inflammatory factors in apoE-null mice. *Mol. Genet. Metab.* 2009;96(4):239–244.
97. Straburzyńska-Migaj E, Gwizdała A, Siniawski A, Ochotny R, Grajek S. Leptin and inflammation in patients with chronic heart failure. *Kardiol. Pol.* 2010;68(11):1243–1247.
98. Sharma V, McNeill JH. The emerging roles of leptin and ghrelin in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2005;3(2):169–180.
99. Hung H-F, Wang B-W, Chang H, Shyu K-G. The molecular regulation of resistin expression in cultured vascular smooth muscle cells under hypoxia. *J. Hypertens.* 2008;26(12):2349–2360.
100. Zhang R, Liu S, Guo B, Chang L, Li Y. Chemerin Induces Insulin Resistance in Rat Cardiomyocytes in Part through the ERK1/2 Signaling Pathway. *Pharmacology.* 2014;94(5–6):259–264.
101. Kunimoto H, Kazama K, Takai M, Oda M, Okada M, Yamawaki H. Chemerin promotes proliferation and migration of vascular smooth muscle and increases mouse blood pressure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2015;ajpheart.00820.2014.
102. Zhang O, Ji Q, Lin Y, Wang Z, Huang Y, Lu W, Liu X, Zhang J, Liu Y, Zhou Y-J. Circulating chemerin levels elevated in dilated cardiomyopathy patients with overt heart failure. *Clin. Chim. Acta.* 2015;448:27–32.
103. Staessen JA, Li Y, Richart T. Oral renin inhibitors. *Lancet.* 2006;368(9545):1449–1456.
104. De Hert S. Physiology of hemodynamic homeostasis. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 2012;26(4):409–419.
105. Young DB. Control of Cardiac Output. *Colloq. Ser. Integr. Syst. Physiol. From Mol. to Funct.* 2010;2(1):1–97.
106. Ivy JR, Bailey MA. Pressure natriuresis and the renal control of arterial blood pressure. *J. Physiol.* 2014;592(18):3955–3967.

107. Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotsoy M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin System in Kidney Physiology. In: *Compr. Physiol.* Vol 4. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2014:1201–1228.
108. Muñoz-Durango N, Fuentes C, Castillo A, González-Gómez L, Vecchiola A, Fardella C, Kalergis A. Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System beyond Blood Pressure Regulation: Molecular and Cellular Mechanisms Involved in End-Organ Damage during Arterial Hypertension. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17(7):797.
109. WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2014. *World Health.* 2014;174(1):176.
110. Andersen K. Renin-angiotensin-aldosterone system in the elderly: rational use of aliskiren in managing hypertension. *Clin. Interv. Aging.* 2009;4(1):137–151.
111. Weber MA, Poulter NR, Schutte AE, Burrell LM, Horiuchi M, Prabhakaran D, Ramirez AJ, Wang J-G, Schiffrin EL, Touyz RM. Is It Time to Reappraise Blood Pressure Thresholds and Targets? *Hypertension.* 2016;68(2):266–268.
112. Bendersky M. Resistant hypertension. *Rev. la Fac. Ciencias Médicas (Córdoba, Argentina).* 2012;69(3):156–159.
113. Timberlake DS, O'Connor DT, Parmer RJ. Molecular genetics of essential hypertension: recent results and emerging strategies. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2001;10(1):71–79.
114. Bie P, Evans RG. Normotension, hypertension and body fluid regulation: Brain and kidney. *Acta Physiol. (Oxf).* 2016.
115. Muiesan ML, Salvetti M, Rizzoni D, Pains A, Agabiti-Rosei C, Aggusti C, Agabiti Rosei E. Resistant hypertension and target organ damage. *Hypertens. Res.* 2013;36(6):485–491.
116. Cheng S, Xanthakis V, Sullivan LM, Lieb W, Massaro J, Aragam J, Benjamin EJ, Vasan RS. Correlates of Echocardiographic Indices of Cardiac Remodeling Over the Adult Life Course: Longitudinal Observations From the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2010;122(6):570–578.
117. Drazner MH. The Progression of Hypertensive Heart Disease. *Circulation.* 2011;123(3):327–334.
118. Lawler PR, Hiremath P, Cheng S. Cardiac target organ damage in hypertension: Insights from epidemiology. *Curr. Hypertens. Rep.* 2014;16(7):1–12.
119. Wood JM, Maibaum J, Rahuel J, Grütter MG, Cohen N-C, Rasetti V, Rüger H, Göschke R, Stutz S, Fuhrer W, Schilling W, Rigollier P, Yamaguchi Y, Cumin F, Baum H-P, et al. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;308(4):698–705.
120. Doroszko A, Janus A, Szahidewicz-Krupska E, Mazur G, Derkacz A. Resistant Hypertension. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2016;25(1):173–183.
121. te Riet L, van Esch JHM, Roks AJM, van den Meiracker AH, Danser AHJ. Hypertension: Renin-Angiotensin-Aldosterone System Alterations. *Circ. Res.* 2015;116(6):960–975.

122. Jan Danser a H, Batenburg WW, van Esch JHM. Prorenin and the (pro)renin receptor--an update. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007;22(5):1288–1292.
123. Santos RA. Angiotensin-(1-7). *Hypertension.* 2014;63(6):1138–1147.
124. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *AJP Cell Physiol.* 2006;292(1):C82–C97.
125. Ferrario CM, Trask AJ, Jessup JA. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005;289(6):H2281–H2290.
126. Gallagher PE, Ferrario CM, Tallant EA. Regulation of ACE2 in cardiac myocytes and fibroblasts. *AJP Hear. Circ. Physiol.* 2008;295(6):H2373–H2379.
127. Passos-Silva DG, Verano-Braga T, Santos RAS. Angiotensin-(1–7): beyond the cardio-renal actions. *Clin. Sci.* 2013;124(7):443–456.
128. Putnam K, Shoemaker R, Yiannikouris F, Cassis LA. The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. *AJP Hear. Circ. Physiol.* 2012;302(6):H1219–H1230.
129. Spät A, Hunyady L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol. Rev.* 2004;84(2):489–539.
130. Gros R, Ding Q, Sklar LA, Prossnitz EE, Arterburn JB, Chorazyczewski J, Feldman RD. GPR30 Expression Is Required for the Mineralocorticoid Receptor-Independent Rapid Vascular Effects of Aldosterone. *Hypertension.* 2011;57(3):442–451.
131. Grossmann C, Benesic A, Krug AW, Freudinger R, Mildemberger S, Gassner B, Gekle M. Human Mineralocorticoid Receptor Expression Renders Cells Responsive for Nongenotropic Aldosterone Actions. *Mol. Endocrinol.* 2005;19(7):1697–1710.
132. Pacurari M, Kafoury R, Tchounwou PB, Ndebele K. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Vascular Inflammation and Remodeling. *Int. J. Inflamm.* 2014;2014:1–13.
133. Bauersachs J, Jaissner F, Toto R. Mineralocorticoid Receptor Activation and Mineralocorticoid Receptor Antagonist Treatment in Cardiac and Renal Diseases. *Hypertension.* 2015;65(2):257–263.
134. Buglioni A, Cannone V, Cataliotti A, Sangaralingham SJ, Heublein DM, Scott CG, Bailey KR, Rodeheffer RJ, Dessì-Fulgheri P, Sarzani R, Burnett JC. Circulating Aldosterone and Natriuretic Peptides in the General Community: Novelty and Significance. *Hypertension.* 2015;65(1):45–53.
135. Kim HS, Krege JH, Kluckman KD, Hagaman JR, Hodgin JB, Best CF, Jennette JC, Coffman TM, Maeda N, Smithies O. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995;92(7):2735–2739.
136. Nagata M, Tanimoto K, Fukamizu A, Kon Y, Sugiyama F, Yagami K, Murakami K, Watanabe T. Nephrogenesis and renovascular development in angiotensinogen-

- deficient mice. *Lab. Invest.* 1996;75(5):745–753.
137. Kregge JH, John SW, Langenbach LL, Hodgin JB, Hagaman JR, Bachman ES, Jennette JC, O'Brien DA, Smithies O. Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature.* 1995;375(6527):146–148.
 138. Oliverio MI, Kim H-S, Ito M, Le T, Audoly L, Best CF, Hiller S, Kluckman K, Maeda N, Smithies O, Coffman TM. Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998;95(26):15496–15501.
 139. Tsuchida S, Matsusaka T, Chen X, Okubo S, Niimura F, Nishimura H, Fogo A, Utsunomiya H, Inagami T, Ichikawa I. Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes. *J. Clin. Invest.* 1998;101(4):755–760.
 140. Yanai K, Saito T, Kakinuma Y, Kon Y, Hirota K, Taniguchi-Yanai K, Nishijo N, Shigematsu Y, Horiguchi H, Kasuya Y, Sugiyama F, Yagami KI, Murakami K, Fukamizu A. Renin-dependent cardiovascular functions and renin-independent blood- brain barrier functions revealed by renin-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 2000;275(1):5–8.
 141. Campbell DJ, Habener JF. Cellular localization of angiotensinogen gene expression in brown adipose tissue and mesentery: Quantification of messenger ribonucleic acid abundance using hybridization in situ. *Endocrinology.* 1987;121(5):1616–1626.
 142. Cassis LA, Lynch KR, Peach MJ. Localization of angiotensinogen messenger RNA in rat aorta. *Circ. Res.* 1988;62(6):1259–1262.
 143. Cassis L, Saye J, Peach M. Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. *Hypertension.* 1988;11(6 Pt 2):591–596.
 144. Campbell DJ, Habener JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J. Clin. Invest.* 1986;78(1):31–39.
 145. Ingelfinger JR, Zuo WM, Fon EA, Ellison KE, Dzau VJ. In Situ hybridization evidence for angiotensinogen messenger RNA in the rat proximal tubule: An hypothesis for the intrarenal renin angiotensin system. *J. Clin. Invest.* 1990;85(2):417–423.
 146. Naruse K, Takii Y, Inagami T. Immunohistochemical localization of renin in luteinizing hormone-producing cells of rat pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1981;78(12):7579–7583.
 147. Ohkubo H, Nakayama K, Tanaka T, Nakanishi S. Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. *J. Biol. Chem.* 1986;261(1):319–323.
 148. Saris JJ, 't Hoen PAC, Garrelds IM, Dekkers DHWW, Den Dunnen JT, Lamers JMJJ, Jan Danser AH, 'T Hoen P a C, Garrelds IM, Dekkers DHWW, Den Dunnen JT, Lamers JMJJ, Danser a. HJ, 'P a C, T Hoen, et al. Prorenin induces intracellular signaling in cardiomyocytes independently of angiotensin II. *Hypertension.* 2006;48(4):564–571.

149. Schweda F, Friis U, Wagner C, Skott O, Kurtz A. Renin Release. *Physiology*. 2007;22(5):310–319.
150. Gradman AH, Kad R. Renin inhibition in hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008;51(5):519–528.
151. Verdecchia P, Angeli F, Mazzotta G, Gentile G, Reboldi G. The renin angiotensin system in the development of cardiovascular disease: role of aliskiren in risk reduction. *Vasc. Health Risk Manag.* 2008;4(5):971–981.
152. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ. Res.* 2000;87(5):E1–E9.
153. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme: Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 2000;275(43):33238–33243.
154. Bindom SM, Hans CP, Xia H, Boulares AH, Lazartigues E. Angiotensin I-converting enzyme type 2 (ACE2) gene therapy improves glycemic control in diabetic mice. *Diabetes*. 2010;59(10):2540–2548.
155. Bindom SM, Lazartigues E. The sweeter side of ACE2: Physiological evidence for a role in diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2009;302(2):193–202.
156. Doobay MF, Talman LS, Obr TD, Tian X, Davisson RL, Lazartigues E. Differential expression of neuronal ACE2 in transgenic mice with overexpression of the brain renin-angiotensin system. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007;292(1):R373–R381.
157. Sriramula S, Cardinale JP, Lazartigues E, Francis J. ACE2 overexpression in the paraventricular nucleus attenuates angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovasc. Res.* 2011;92(3):401–408.
158. Xia H, Suda S, Bindom S, Feng Y, Gurley SB, Seth D, Navar LG, Lazartigues E. ACE2-Mediated reduction of oxidative stress in the central nervous system is associated with improvement of autonomic function. Blagosklonny M V., ed. *PLoS One*. 2011;6(7):e22682.
159. Xu P, Sriramula S, Lazartigues E. ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: the axis of good. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2011;300(4):R804–R817.
160. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 2002;277(17):14838–14843.
161. Santos RAS, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SVB, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss H-P, Speth R, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100(14):8258–8263.
162. Nakamoto H, Ferrario CM, Fuller SB, Robaczewski DL, Winicov E, Dean RH.

- Angiotensin-(1-7) and Nitric Oxide Interaction in Renovascular Hypertension. *Hypertension*. 1995;25(4):796–802.
163. Simões E Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, Teixeira MM. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br. J. Pharmacol*. 2013;169(3):477–492.
 164. Oudit GY, Liu GC, Zhong J, Basu R, Chow FL, Zhou J, Loibner H, Janzek E, Schuster M, Penninger JM, Herzenberg AM, Kassiri Z, Scholey JW. Human recombinant ACE2 reduces the progression of diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2010;59(2):529–538.
 165. Soler MJ, Wysocki J, Batlle D. ACE2 alterations in kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2013;28(11):2687–2697.
 166. Wong DW, Oudit GY, Reich H, Kassiri Z, Zhou J, Liu QC, Backx PH, Penninger JM, Herzenberg AM, Scholey JW. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 (Ace2) accelerates diabetic kidney injury. *Am. J. Pathol*. 2007;171(2):438–451.
 167. Zhong JC, Ye JY, Jin HY, Yu X-Y, Yu HM, Zhu DL, Gao PJ, Huang DY, Shuster M, Loibner H, Guo JM, Yu XY, Xiao BX, Gong ZH, Penninger JM, et al. Telmisartan attenuates aortic hypertrophy in hypertensive rats by the modulation of ACE2 and profilin-1 expression. *Regul. Pept*. 2011;166(1–3):90–97.
 168. Zhang F, Liu J, Li S-F, Song J-X, Ren J-Y, Chen H. Angiotensin-(1-7): new perspectives in atherosclerosis treatment. *J. Geriatr. Cardiol*. 2015;12(6):676–682.
 169. Bueno OF. Involvement of Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2 in Cardiac Hypertrophy and Cell Death. *Circ. Res*. 2002;91(9):776–781.
 170. Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ. Res*. 1988;62(4):749–756.
 171. Tsai I-C, Pan Z-C, Cheng H-P, Liu C-H, Lin B-T, Jiang MJ. Reactive oxygen species derived from NADPH oxidase 1 and mitochondria mediate angiotensin II-induced smooth muscle cell senescence. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2016;98:18–27.
 172. Davisson RL, Oliverio MI, Coffman TM, Sigmund CD. Divergent functions of angiotensin II receptor isoforms in the brain. *J. Clin. Invest*. 2000;106(1):103–106.
 173. Teshima Y, Takahashi N, Nishio S, Saito S, Kondo H, Fukui A, Aoki K, Yufu K, Nakagawa M, Saikawa T. Production of Reactive Oxygen Species in the Diabetic Heart. *Circ. J*. 2014;78(2):300–306.
 174. Bruder-Nascimento T, Chinnasamy P, Riascos-Bernal DF, Cau SB, Callera GE, Touyz RM, Tostes RC, Sibinga NES. Angiotensin II induces Fat1 expression/activation and vascular smooth muscle cell migration via Nox1-dependent reactive oxygen species generation. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2014;66(164):18–26.
 175. Albiston AL, Mustafa T, McDowall SG, Mendelsohn FAO, Lee J, Chai SY. AT4 receptor is insulin-regulated membrane aminopeptidase: Potential mechanisms of memory enhancement. *Trends Endocrinol. Metab*. 2003;14(2):72–77.
 176. Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FAO, Jenkins TA, Albiston AL.

- The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004;61(21):2728–2737.
177. Beyer CE, Dwyer JM, Platt BJ, Neal S, Luo B, Ling HP, Lin Q, Mark RJ, Rosenzweig-Lipson S, Schechter LE. Angiotensin IV elevates oxytocin levels in the rat amygdala and produces anxiolytic-like activity through subsequent oxytocin receptor activation. *Psychopharmacology (Berl)*. 2010;209(4):303–311.
 178. Wright JW, Harding JW. Brain renin-angiotensin-A new look at an old system. *Prog. Neurobiol.* 2011;95(1):49–67.
 179. Yang H, Zeng XJ, Wang HX, Zhang LK, Dong XL, Guo S, Du J, Li HH, Tang CS. Angiotensin IV protects against angiotensin II-induced cardiac injury via AT4 receptor. *Peptides*. 2011;32(10):2108–2115.
 180. Zhang W, Xia X, Reisenauer MR, Rieg T, Lang F, Kuhl D, Vallon V, Kone BC. Aldosterone-induced Sgk1 relieves Dot1a-Af9-mediated transcriptional repression of epithelial Na⁺ channel α . *J. Clin. Invest.* 2007;117(3):773–783.
 181. Koenig JB, Jaffe IZ. Direct role for smooth muscle cell mineralocorticoid receptors in vascular remodeling: Novel mechanisms and clinical implications. *Curr. Hypertens. Rep.* 2014;16(5):427.
 182. Montezano AC, Callera GE, Yogi A, He Y, Tostes RC, He G, Schiffrin EL, Touyz RM. Aldosterone and angiotensin II synergistically stimulate migration in vascular smooth muscle cells through c-Src-regulated Redox-sensitive RhoA pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008;28(8):1511–1518.
 183. Pruthi D, Mccurley A, Aronovitz M, Galayda C, Karumanchi SA, Jaffe IZ. Aldosterone promotes vascular remodeling by direct effects on smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014;34(2):355–364.
 184. Galmiche G, Pizard A, Gueret A, El Moghrabi S, Ouvrard-Pascaud A, Berger S, Challande P, Jaffe IZ, Labat C, Lacolley P, Jaisser F. Smooth muscle cell mineralocorticoid receptors are mandatory for aldosterone-salt to induce vascular stiffness. *Hypertension*. 2014;63(3):520–526.
 185. Oberleithner H, Riethmüller C, Schillers H, MacGregor GA, de Wardener HE, Hausberg M. Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007;104(41):16281–16286.
 186. Laureys G, Barton DE, Ullrich A, Francke U. Chromosomal mapping of the gene for the type II insulin-like growth factor receptor/cation-independent mannose 6-phosphate receptor in man and mouse. *Genomics*. 1988;3(3):224–229.
 187. Heger J, Schlüter K-D. Renin and the IGFII/M6P Receptor System in Cardiac Biology. *Sci. World J.* 2013;2013:1–10.
 188. Batenburg WW, Danser AHJ. (Pro)renin and its receptors: pathophysiological implications. *Clin. Sci.* 2012;123(3):121–133.
 189. Kinouchi K, Ichihara A, Sano M, Sun-Wada G-H, Wada Y, Kurauchi-Mito A, Bokuda K, Narita T, Oshima Y, Sakoda M, Tamai Y, Sato H, Fukuda K, Itoh H. The (Pro)renin Receptor/ATP6AP2 is Essential for Vacuolar H⁺-ATPase Assembly in Murine Cardiomyocytes. *Circ. Res.* 2010;107(1):30–34.

190. Trepiccione F, Gerber SD, Grahammer F, Lopez-Cayuqueo KI, Baudrie V, Paunescu TG, Capen DE, Picard N, Alexander RT, Huber TB, Chambrey R, Brown D, Houillier P, Eladari D, Simons M. Renal Atp6ap2/(Pro)renin Receptor Is Required for Normal Vacuolar H⁺-ATPase Function but Not for the Renin-Angiotensin System. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2016;1–11.
191. Batenburg WW, Lu X, Leijten F, Maschke U, Muller DN, Danser AHJ. Renin- and Prorenin-Induced Effects in Rat Vascular Smooth Muscle Cells Overexpressing the Human (Pro)Renin Receptor: Does (Pro)Renin-(Pro)Renin Receptor Interaction Actually Occur? *Hypertension.* 2011;58(6):1111–1119.
192. Xu C, Lu A, Wang H, Fang H, Zhou L, Sun P, Yang T. (Pro)Renin Receptor Regulates Potassium Homeostasis through a Local Mechanism. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 2016;ajprenal.00043.2016.
193. Gonzalez AA, Prieto MC. Roles of collecting duct renin and (pro)renin receptor in hypertension: mini review. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* 2015;9(4):191–200.
194. Ramkumar N, Kohan DE. The nephron (pro)renin receptor: function and significance. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 2016;ajprenal.00476.2016.
195. Xu Q, Jensen DD, Peng H, Feng Y. The critical role of the central nervous system (pro)renin receptor in regulating systemic blood pressure. *Pharmacol. Ther.* 2016;164:126–134.
196. Shamansurova Z, Tan P, Ahmed B, Pepin E, Seda O, Lavoie JL. Adipose tissue (P)RR regulates insulin sensitivity, fat mass and body weight. *Mol. Metab.* 2016;5(10):959–969.
197. Huber MJ, Basu R, Cecchetti C, Cuadra AE, Chen Q-H, Shan Z. Activation of the (pro)renin receptor in the paraventricular nucleus increases sympathetic outflow in anesthetized rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2015;309(5):H880–H887.
198. De Mello WC. Intracellular angiotensin II as a regulator of muscle tone in vascular resistance vessels. Pathophysiological implications. *Peptides.* 2016;78:87–90.
199. Li XC, Zhuo JL. Intracellular ANG II directly induces in vitro transcription of TGF-1, MCP-1, and NHE-3 mRNAs in isolated rat renal cortical nuclei via activation of nuclear AT1a receptors. *AJP Cell Physiol.* 2008;294(4):C1034–C1045.
200. Reudelhuber TL, Bernstein KE, Delafontaine P. Is Angiotensin II a Direct Mediator of Left Ventricular Hypertrophy?: Time for Another Look. *Hypertension.* 2007;49(6):1196–1201.
201. van Esch JHM, Gembardt F, Sterner-Kock A, Heringer-Walther S, Le TH, Lassner D, Stijnen T, Coffman TM, Schultheiss HP, Danser AHJ, Walther T. Cardiac phenotype and angiotensin II levels in AT1a, AT1b, and AT2 receptor single, double, and triple knockouts. *Cardiovasc. Res.* 2010;86(3):401–409.
202. Matsusaka T, Niumura F, Shimizu A, Pastan I, Saito A, Kobori H, Nishiyama A, Ichikawa I. Liver Angiotensinogen Is the Primary Source of Renal Angiotensin II. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2012;23(7):1181–1189.
203. Van Kats JP, Schalekamp MADH, Verdouw PD, Duncker DJ, Danser AHJ. Intrarenal angiotensin II: Interstitial and cellular levels and site of production. *Kidney*

- Int.* 2001;60(6):2311–2317.
204. van Kats JP, de Lannoy LM, Danser AHJ, van Meegen JR, Verdouw PD, Schalekamp MADH. Angiotensin II Type 1 (AT1) Receptor Mediated Accumulation of Angiotensin II in Tissues and Its Intracellular Half-life In Vivo. *Hypertension*. 1997;30(1):42–49.
 205. De Mello WC, Frohlich ED. Clinical Perspectives and Fundamental Aspects of Local Cardiovascular and Renal Renin-Angiotensin Systems. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2014;5:1–9.
 206. Bader M, Ganten D. Update on tissue renin–angiotensin systems. *J. Mol. Med.* 2008;86(6):615–621.
 207. Sernerri GG, Boddi M, Cecioni I, Vanni S, Coppo M, Papa ML, Bandinelli B, Bertolozzi I, Polidori G, Toscano T, Maccherini M, Modesti PA. Cardiac angiotensin II formation in the clinical course of heart failure and its relationship with left ventricular function. *Circ. Res.* 2001;88(9):961–968.
 208. Kurdi M, Mello WC De, Booz GW. Working outside the system: an update on the unconventional behavior of the renin–angiotensin system components. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005;37(7):1357–1367.
 209. Danser AH, van Kats JP, Admiraal PJ, Derkx FH, Lamers JM, Verdouw PD, Saxena PR, Schalekamp MA. Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)*. 1994;24(1):37–48.
 210. De Mello WC, Danser AH. Angiotensin II and the heart: on the intracrine renin–angiotensin system. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)*. 2000;35(6):1183–1188.
 211. Clausmeyer S, Stürzebecher R, Peters J. An alternative transcript of the rat renin gene can result in a truncated prorenin that is transported into adrenal mitochondria. *Circ. Res.* 1999;84(3):337–344.
 212. Kantachuvesiri S, Fleming S, Peters J, Peters B, Brooker G, Lammie AG, McGrath I, Kotelevtsev Y, Mullins JJ. Controlled Hypertension, a Transgenic Toggle Switch Reveals Differential Mechanisms Underlying Vascular Disease. *J. Biol. Chem.* 2001;276(39):36727–36733.
 213. Alvarez A, Cerdá-Nicolás M, Naim Abu Nabah Y, Mata M, Issekutz AC, Panés J, Lobb RR, Sanz M-J. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood*. 2004;104(2):402–408.
 214. Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CAH, Hagl S, Libby P, Kubler W. Angiotensin Induces Inflammatory Activation of Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999;19(7):1623–1629.
 215. Hahn AW, Jonas U, Bühler FR, Resink TJ. Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. *FEBS Lett.* 1994;347(2–3):178–180.
 216. Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin–angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation*. 1999;100(11):1223–1229.

217. Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1998;83(9):952–959.
218. Becher UM, Endtmann C, Tiyerili V, Nickenig G, Werner N. Endothelial damage and regeneration: the role of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Curr. Hypertens. Rep.* 2011;13(1):86–92.
219. Martinez FA. Aldosterone Inhibition and Cardiovascular Protection: More Important Than it Once Appeared. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2010;24(4):345–350.
220. Rocha R, Rudolph AE, Friedrich GE, Nachowiak DA, Kekec BK, Blomme EAG, McMahon EG, Delyani JA. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 2002;283(5):H1802–H1810.
221. Lopez-Andres N, Martin-Fernandez B, Rossignol P, Zannad F, Lahera V, Fortuno MA, Cachofeiro V, Diez J. A role for cardiotrophin-1 in myocardial remodeling induced by aldosterone. *AJP Hear. Circ. Physiol.* 2011;301(6):H2372–H2382.
222. Dartsch T, Fischer R, Gapelyuk A, Weiergraeber M, Ladage D, Schneider T, Schirdewan A, Reuter H, Mueller-Ehmsen J, Zobel C. Aldosterone induces electrical remodeling independent of hypertension. *Int. J. Cardiol.* 2013;164(2):170–178.
223. Cascella T, Radhakrishnan Y, Maile LA, Busby WH, Gollahon K, Colao A, Clemmons DR. Aldosterone Enhances IGF-I-Mediated Signaling and Biological Function in Vascular Smooth Muscle Cells. *Endocrinology.* 2010;151(12):5851–5864.
224. Sherajee SJ, Fujita Y, Rafiq K, Nakano D, Mori H, Masaki T, Hara T, Kohno M, Nishiyama A, Hitomi H. Aldosterone Induces Vascular Insulin Resistance by Increasing Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor and Hybrid Receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012;32(2):257–263.
225. Cooper SA, Whaley-Connell A, Habibi J, Wei Y, Lastra G, Manrique C, Stas S, Sowers JR. Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007;293(4):H2009–H2023.
226. Kaplan NM. Lifestyle Modifications for Prevention and Treatment of Hypertension. *J. Clin. Hypertens.* 2004;6(12):716–719.
227. Appel LJ, Champagne CM, Harsha DW, Cooper LS, Obarzanek E, Elmer PJ, Stevens VJ, Vollmer WM, Lin P-H, Svetkey LP, Stedman SW, Young DR. Effects of Comprehensive Lifestyle Modification on Blood Pressure Control. *JAMA.* 2003;289(16):2083–2093.
228. Makani H, Bangalore S, Romero J, Wever-Pinzon O, Messerli FH. Effect of Renin-Angiotensin System Blockade on Calcium Channel Blocker-Associated Peripheral Edema. *Am. J. Med.* 2011;124(2):128–135.
229. Oparil S, Schmieder RE. New Approaches in the Treatment of Hypertension. *Circ. Res.* 2015;116(6):1074–1095.
230. Schiffrin EL. Effects of Aldosterone on the Vasculature. *Hypertension.* 2006;47(3):312–318.

231. Amar L, Azizi M, Menard J, Peyrard S, Plouin P-F. Sequential comparison of aldosterone synthase inhibition and mineralocorticoid blockade in patients with primary aldosteronism. *J. Hypertens.* 2013;31(3):624–629.
232. Colussi G, Catena C, Sechi LA. Spironolactone, eplerenone and the new aldosterone blockers in endocrine and primary hypertension. *J. Hypertens.* 2013;31(1):3–15.
233. Jansen PM, van den Meiracker AH, Jan Danser AH. Aldosterone synthase inhibitors: pharmacological and clinical aspects. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 2009;10(4):319–326.
234. Azizi M, Amar L, Menard J. Aldosterone synthase inhibition in humans. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2013;28(1):36–43.
235. Muller DN. Direct Renin Inhibition with Aliskiren in Hypertension and Target Organ Damage. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2006;1(2):221–228.
236. Wolf-Maier K, Cooper RS, Kramer H, Banegas JR, Giampaoli S, Joffres MR, Poulter N, Primatesta P, Stegmayr B, Thamm M. Hypertension Treatment and Control in Five European Countries, Canada, and the United States. *Hypertension.* 2004;43(1):10–17.
237. Cordero A, Bertomeu-Martínez V, Mazón P, Fácila L, Bertomeu-González V, Cosín J, Galve E, Núñez J, Lekuona I, González-Juanatey JR. Factores asociados a la falta de control de la hipertensión arterial en pacientes con y sin enfermedad cardiovascular. *Rev. Española Cardiol.* 2011;64(7):587–593.
238. Chobanian A V, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Roccella EJ. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension.* 2003;42(6):1206–1252.
239. Persell SD. Prevalence of Resistant Hypertension in the United States, 2003–2008. *Hypertension.* 2011;57(6):1076–1080.
240. Fontenla A, García-Donaire JA, Hernández F, Segura J, Salgado R, Cerezo C, Ruilope LM, Arribas F. Management of Resistant Hypertension in a Multidisciplinary Unit of Renal Denervation: Protocol and Results. *Rev. Española Cardiol. (English Ed.)* 2013;66(5):364–370.
241. Ferreira AJ, Murça TM, Fraga-Silva RA, Castro CH, Raizada MK, Santos RAS. New Cardiovascular and Pulmonary Therapeutic Strategies Based on the Angiotensin-Converting Enzyme 2/Angiotensin-(1–7)/Mas Receptor Axis. *Int. J. Hypertens.* 2012;2012:1–13.
242. Jiang F, Yang J, Zhang Y, Dong M, Wang S, Zhang Q, Liu FF, Zhang K, Zhang C. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin 1–7: novel therapeutic targets. *Nat. Rev. Cardiol.* 2014;11(7):413–426.
243. Fraga-Silva RA, Ferreira AJ, dos Santos RAS. Opportunities for Targeting the Angiotensin-Converting Enzyme 2/Angiotensin-(1–7)/Mas Receptor Pathway in Hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* 2013;15(1):31–38.
244. Ferreira AJ, Shenoy V, Qi Y, Fraga-Silva RA, Santos RAS, Katovich MJ, Raizada MK. Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against hypertension-

- induced cardiac fibrosis involving extracellular signal-regulated kinases. *Exp. Physiol.* 2011;96(3):287–294.
245. Kulemina L V, Ostrov DA. Prediction of Off-Target Effects on Angiotensin-Converting Enzyme 2. *J. Biomol. Screen.* 2011;16(8):878–885.
 246. Petty WJ, Miller AA, McCoy TP, Gallagher PE, Tallant EA, Torti FM. Phase I and Pharmacokinetic Study of Angiotensin-(1-7), an Endogenous Antiangiogenic Hormone. *Clin. Cancer Res.* 2009;15(23):7398–7404.
 247. Rodgers KE, Oliver J, DiZerega GS. Phase I/II dose escalation study of angiotensin 1-7 [A(1-7)] administered before and after chemotherapy in patients with newly diagnosed breast cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2006;57(5):559–568.
 248. Savergnini SQ, Ianzer D, Carvalho MBL, Ferreira AJ, Silva GAB, Marques FD, Peluso AAB, Beiman M, Cojocar G, Cohen Y, Almeida AP, Rotman G, Santos RAS. The Novel Mas agonist, CGEN-856S, Attenuates Isoproterenol-Induced Cardiac Remodeling and Myocardial Infarction Injury in Rats. Bader M, ed. *PLoS One.* 2013;8(3):e57757.
 249. Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F, Jankowski J, Jankowski V, Sousa F, Alzamora A, Soares E, Barbosa C, Kjeldsen F, Oliveira A, Braga J, et al. Discovery and Characterization of Alamandine: A Novel Component of the Renin-Angiotensin System. *Circ. Res.* 2013;112(8):1104–1111.
 250. Morganti A, Lonati C. Aliskiren: The first direct renin inhibitor available for clinical use. *J. Nephrol.* 2011;24:541–549.
 251. Umezawa H, Aoyagi T, Morishima H, Matsuzaki M, Hamada M. Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes. *J. Antibiot. (Tokyo).* 1970;23(5):259–262.
 252. Gross F, Lazar J, Orth H. Inhibition of the renin-angiotensinogen reaction by pepstatin. *Science.* 1972;175(4022):656.
 253. Cumin F, Evin G, Fehrentz JA, Seyer R, Castro B, Menard J, Corvol P. Inhibition of human renin by synthetic peptides derived from its prosegment. *J. Biol. Chem.* 1985;260(16):9154–9157.
 254. Riccioni G, Vitulano N, Zanasi A, Bellocchi F, d'Orazio N. Aliskiren: beyond blood pressure reduction. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2010;19(10):1265–74.
 255. Pimenta E, Oparil S. Role of aliskiren in cardio-renal protection and use in hypertensives with multiple risk factors. *Vasc. Health Risk Manag.* 2009;5(1):453–463.
 256. Krop M, Garrelds IM, de Bruin RJA, van Gool JMG, Fisher NDL, Hollenberg NK, Jan Danser AH. Aliskiren Accumulates in Renin Secretory Granules and Binds Plasma Prorenin. *Hypertension.* 2008;52(6):1076–1083.
 257. Musini VM, Fortin PM, Bassett K, Wright JM. Blood pressure lowering efficacy of renin inhibitors for primary hypertension: a Cochrane systematic review. *J. Hum. Hypertens.* 2009;23(8):495–502.
 258. Shafiq MM, Menon D V, Victor RG. Oral Direct Renin Inhibition: Premise, Promise, and Potential Limitations of a New Antihypertensive Drug. *Am. J. Med.* 2008;121(4):265–271.

259. Morishita Y, Kusano E. The effects of direct renin inhibitor, aliskiren, on arterial hypertension, chronic kidney disease and cardiovascular disease: optimal pharmacotherapy. *Cardiovasc Hematol. Agents Med Chem.* 2013;11:77–82.
260. Sen S, Sabırlı S, Ozyiğit T, Uresin Y. Aliskiren: review of efficacy and safety data with focus on past and recent clinical trials. *Ther. Adv. Chronic Dis.* 2013;4:232–41.
261. Solomon SD, Appelbaum E, Manning WJ, Verma A, Berglund T, Lukashevich V, Cherif Papst C, Smith BA, Dahlof B. Effect of the Direct Renin Inhibitor Aliskiren, the Angiotensin Receptor Blocker Losartan, or Both on Left Ventricular Mass in Patients With Hypertension and Left Ventricular Hypertrophy. *Circulation.* 2009;119(4):530–537.
262. McMurray JJV, Pitt B, Latini R, Maggioni AP, Solomon SD, Keefe DL, Ford J, Verma A, Lewsey J. Effects of the Oral Direct Renin Inhibitor Aliskiren in Patients With Symptomatic Heart Failure. *Circ. Hear. Fail.* 2008;1(1):17–24.
263. Zaporowska-Stachowiak I, Hoffmann K, Bryl W, Minczykowski A. State of the art paper Aliskiren – an alternative to angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers in the therapy of arterial hypertension. *Arch. Med. Sci.* 2014;4(4):830–836.
264. Wu H, Cheng XW, Hu L, Hao C-N, Hayashi M, Takeshita K, Hamrah MS, Shi G-P, Kuzuya M, Murohara T. Renin inhibition reduces atherosclerotic plaque neovessel formation and regresses advanced atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* 2014;237(2):739–747.
265. Kappel BA, Federici M. Can renin inhibition by Aliskiren prove itself in atherosclerosis prevention? *Atherosclerosis.* 2014;237(2):767–768.
266. Gu Y, Tang X, Xie L, Meng G, Ji Y. Aliskiren improves endothelium-dependent relaxation of thoracic aorta by activating PI3K/Akt/eNOS signal pathway in SHR. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2016:n/a-n/a.
267. Jumar A, Ott C, Kistner I, Friedrich S, Schmidt S, Harazny JM, Schmieder RE. Effect of aliskiren on vascular remodelling in small retinal circulation. *J. Hypertens.* 2015:1.
268. Raptis AE, Markakis KP, Mazioti MC, Ikonomidis I, Maratou EP, Vlahakos D V, Kotsifaki EE, Voumvourakis AN, Tsirogianni AG, Lambadiari VA, Lekakis JP, Raptis SA, Dimitriadis GD. Effect of aliskiren on circulating endothelial progenitor cells and vascular function in patients with type 2 diabetes and essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* 2015;28(1):22–29.
269. Koid SS, Ziogas J, Campbell DJ. Aliskiren Reduces Myocardial Ischemia–Reperfusion Injury by a Bradykinin B 2 Receptor– and Angiotensin AT 2 Receptor–Mediated Mechanism Novelty and Significance. *Hypertension.* 2014;63(4):768–773.
270. Zhang W, Han Y, Meng G, Bai W, Xie L, Lu H, Shao Y, Wei L, Pan S, Zhou S, Chen Q, Ferro A, Ji Y. Direct Renin Inhibition With Aliskiren Protects Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Activating Nitric Oxide Synthase Signaling in Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Am. Heart Assoc.* 2014;3(1):e000606.
271. Zhi H, Luptak I, Alreja G, Shi J, Guan J, Metes-Kosik N, Joseph J. Effects of direct

- renin inhibition on myocardial fibrosis and cardiac fibroblast function. *PLoS One*. 2013;8(12):1–9.
272. Weng L, Zhang W, Ye Y, Yin P, Yuan J, Wang X, Kang L, Jiang S, You J, Wu J, Gong H, Ge J, Zou Y. Aliskiren ameliorates pressure overload-induced heart hypertrophy and fibrosis in mice. *Acta Pharmacol. Sin*. 2014;35(8):1005–1014.
 273. Zhang W, Zhao G, Hu X, Wang M, Li H, Ye Y, Du Q, Yao J, Bao Z, Hong W, Fu G, Ge J, Qiu Z. Aliskiren-attenuated myocardium apoptosis via regulation of autophagy and connexin-43 in aged spontaneously hypertensive rats. *J. Cell. Mol. Med*. 2014;18(7):1247–1256.
 274. Fogari R, Zoppi A, Mugellini A, Lazzari P, Derosa G. Different Effects of Aliskiren and Losartan on Fibrinolysis and Insulin Sensitivity in Hypertensive Patients with Metabolic Syndrome. *Horm. Metab. Res*. 2010;42(12):892–896.
 275. Chou C-L, Lai Y-H, Lin T-Y, Lee T-JF, Fang T-C. Aliskiren prevents and ameliorates metabolic syndrome in fructose-fed rats. *Arch. Med. Sci*. 2011;5(5):882–888.
 276. Stucchi P, Cano V, Ruiz-Gayo M, Fernández-Alfonso MS. Aliskiren reduces body-weight gain, adiposity and plasma leptin during diet-induced obesity. *Br. J. Pharmacol*. 2009;158(3):771–778.
 277. Hassanin A, Malek HA. Effect of renin inhibition on adipokines in diabetic rats. *Pak. J. Pharm. Sci*. 2014;27(4):767–772.
 278. Wang W, Qiu L, Howard A, Solis N, Li C, Wang X, Kopp JB, Levi M. Protective effects of aliskiren and valsartan in mice with diabetic nephropathy. *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst*. 2014;15(4):384–395.
 279. Lee K, Hsieh Y, Yang Y, Chan C, Huang Y-H, Lin H-C. Aliskiren Reduces Hepatic steatosis and Epididymal Fat Mass and Increases Skeletal Muscle Insulin Sensitivity in High-Fat Diet-Fed Mice. *Sci. Rep*. 2016;6(April 2015):18899.
 280. Karcioğlu SS, Palabiyik SS, Bayir Y, Karakus E, Mercantepe T, Halici Z, Albayrak A. The Role of RAAS Inhibition by Aliskiren on Paracetamol-Induced Hepatotoxicity Model in Rats. *J. Cell. Biochem*. 2016;117(3):638–646.
 281. Vakilzadeh N, Muller M, Forni V, Milani B, Piskunowicz M, Zweigacker C, Vogt B, Pruijm M, Burnier M. 1D.02: COMPARATIVE EFFECT OF A RENIN INHIBITOR AND A THIAZIDE DIURETIC ON RENAL TISSUE OXYGENATION IN HYPERTENSIVE PATIENTS. *J. Hypertens*. 2015;33 Suppl 1:e14.
 282. Asker SA, Mazroa SA, Boshra V, Hassan AM. Biochemical and histological impact of direct renin inhibition by aliskiren on myofibroblasts activation and differentiation in bleomycin induced pulmonary fibrosis in adult mice. *Tissue Cell*. 2015.
 283. Zhou G, Liu X, Cheung AK, Huang Y. Efficacy of aliskiren, compared with angiotensin II blockade, in slowing the progression of diabetic nephropathy in db/db mice: should the combination therapy be a focus? *Am. J. Transl. Res*. 2015;7(5):825–840.

284. Zhao Z, Chen Y, Li W, Wang X, Li J, Yang W, Cheng L, Liu T, Liu E, Li G. Aliskiren protecting atrial structural remodeling from rapid atrial pacing in a canine model. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* 2016;389(8):863–871.
285. Mengal V, Silva PH, Tiradentes R V, Santuzzi CH, de Almeida SA, Sena GC, Bissoli NS, Abreu GR, Gouvea SA. Aliskiren and l-arginine treatments restore depressed baroreflex sensitivity and decrease oxidative stress in renovascular hypertension rats. *Hypertens. Res.* 2016.
286. Bayir Y, Cadirci E, Polat B, Kilic Baygutalp N, Albayrak A, Karakus E, Un H, Keles MS, Kocak Ozgeris FB, Toktay E, Karaca M, Halici Z. Aliskiren - a promising strategy for ovarian ischemia/reperfusion injury protection in rats via RAAS. *Gynecol. Endocrinol.* 2016:1–9.
287. Abuelezz SA, Hendawy N, Osman WM. Aliskiren attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats: focus on oxidative stress, advanced glycation end products, and matrix metalloproteinase-9. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* 2016;389(8):897–909.
288. Sakoda M, Ichihara A, Kurauchi-Mito A, Narita T, Kinouchi K, Murohashi-Bokuda K, Saleem MA, Nishiyama A, Suzuki F, Itoh H. Aliskiren Inhibits Intracellular Angiotensin II Levels Without Affecting (Pro)renin Receptor Signals in Human Podocytes. *Am. J. Hypertens.* 2010;23(5):575–580.
289. Feldt S, Batenburg WW, Mazak I, Maschke U, Wellner M, Kvakan H, Dechend R, Fiebeler A, Burckle C, Contrepas A, Jan Danser AH, Bader M, Nguyen G, Luft FC, Muller DN. Prorenin and Renin-Induced Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Activation in Monocytes Is Not Blocked by Aliskiren or the Handle-Region Peptide. *Hypertension.* 2008;51(3):682–688.
290. Feldman DL, Jin L, Xuan H, Contrepas A, Zhou Y, Webb RL, Mueller DN, Feldt S, Cumin F, Maniara W, Persohn E, Schuetz H, Jan Danser AH, Nguyen G. Effects of Aliskiren on Blood Pressure, Albuminuria, and (Pro)Renin Receptor Expression in Diabetic TG(mRen-2)27 Rats. *Hypertension.* 2008;52(1):130–136.
291. Batenburg WW, de Bruin RJA, van Gool JMG, Muller DN, Bader M, Nguyen G, Danser AHJ. Aliskiren-Binding Increases the Half Life of Renin and Prorenin in Rat Aortic Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008;28(6):1151–1157.
292. Tsai CF, Chen YC, Lin YK, Chen SA, Chen YJ. Electromechanical effects of the direct renin inhibitor (aliskiren) on the pulmonary vein and atrium. *Basic Res. Cardiol.* 2011;106:979–993.
293. Brown MJ. Aliskiren. *Circulation.* 2008;118(7):773–784.
294. Armstrong MT, Lee DY, Armstrong PB. Regulation of proliferation of the fetal myocardium. *Dev. Dyn.* 2000;219(2):226–36.
295. Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998;95(6):2979–84.
296. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application

- to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 1983;65(1–2):55–63.
297. Lear P V., Iglesias MJ, Feijóo-Bandín S, Rodríguez-Penas D, Mosquera-Leal A, García-Rúa V, Gualillo O, Ghè C, Arnoletti E, Muccioli G, Diéguez C, González-Juanatey JR, Lago F. Des-acyl ghrelin has specific binding sites and different metabolic effects from ghrelin in cardiomyocytes. *Endocrinology*. 2010;151(7):3286–3298.
 298. Abumrad NA, Goldberg IJ. CD36 actions in the heart: Lipids, calcium, inflammation, repair and more? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. 2016;1861(10):1442–1449.
 299. Kim TT, Dyck JRBB. The role of CD36 in the regulation of myocardial lipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. 2016;1861(10):1450–1460.
 300. Abel EDD. Glucose transport in the heart. *Front. Biosci*. 2004;9(1):201–215.
 301. Luiken JJFP, Glatz JFC, Neumann D. Cardiac contraction-induced GLUT4 translocation requires dual signaling input. *Trends Endocrinol. Metab*. 2015;26(8):404–410.
 302. Montessuit C, Lerch R. Regulation and dysregulation of glucose transport in cardiomyocytes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res*. 2013;1833(4):848–856.
 303. Chen Y, Pat B, Zheng J, Cain L, Powell P, Shi K, Sabri A, Husain A, Dell'Italia LJ. Tumor necrosis factor- α produced in cardiomyocytes mediates a predominant myocardial inflammatory response to stretch in early volume overload. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2010;49(1):70–78.
 304. Saban MR, O'Donnell MA, Hurst RE, Wu X-R, Simpson C, Dozmorov I, Davis C, Saban R. Molecular networks discriminating mouse bladder responses to intravesical bacillus Calmette-Guerin (BCG), LPS, and TNF- α . *BMC Immunol*. 2008;9(1):4.
 305. Wang G, Zhu X, Xie W, Han P, Li K, Sun Z, Wang Y, Chen C, Song R, Cao C, Zhang J, Wu C, Liu J, Cheng H. Rad As a Novel Regulator of Excitation-Contraction Coupling and β -Adrenergic Signaling in Heart. *Circ. Res*. 2010;106(2):317–327.
 306. Chang L, Zhang J, Tseng Y-H, Xie C-Q, Ilany J, Bruning JC, Sun Z, Zhu X, Cui T, Youker KA, Yang Q, Day SM, Kahn CR, Chen YE. Rad GTPase Deficiency Leads to Cardiac Hypertrophy. *Circulation*. 2007;116(25):2976–2983.
 307. Yada H, Murata M, Shimoda K, Yuasa S, Kawaguchi H, Ieda M, Adachi T, Murata M, Ogawa S, Fukuda K. Dominant Negative Suppression of Rad Leads to QT Prolongation and Causes Ventricular Arrhythmias via Modulation of L-type Ca^{2+} Channels in the Heart. *Circ. Res*. 2007;101(1):69–77.
 308. Yamakawa T, Sugimoto K, Whitson RH, Itakura K. Modulator recognition factor-2 regulates triglyceride metabolism in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2010;391(1):277–281.
 309. Masuda K, Ripley B, Nishimura R, Mino T, Takeuchi O, Shioi G, Kiyonari H, Kishimoto T. Arid5a controls IL-6 mRNA stability, which contributes to elevation of IL-6 level in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2013;110(23):9409–9414.

310. Weintraub HS, Tran H, Schwartzbard A. Potential Benefits of Aliskiren Beyond Blood Pressure Reduction. *Cardiol. Rev.* 2011;19(2):90–94.
311. van Esch JH, Moltzer E, van Veghel R, Garrelds IM, Leijten F, Bouhuizen AM, Danser AJ. Beneficial cardiac effects of the renin inhibitor aliskiren in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 2010;28(10):2145–2155.
312. Rashikh A, Ahmad SJ, Pillai KK, Kohli K, Najmi AK. Aliskiren attenuates myocardial apoptosis and oxidative stress in chronic murine model of cardiomyopathy. *Biomed. Pharmacother.* 2012;66(2):138–143.
313. Connelly K a., Advani a., Advani S, Zhang Y, Thai K, Thomas S, Krum H, Kelly DJ, Gilbert RE. Combination Angiotensin Converting Enzyme and Direct Renin Inhibition in Heart Failure following Experimental Myocardial Infarction. *Cardiovasc. Ther.* 2013;31:84–91.
314. Artinian SB, Al Lafi SM, Boutary SS, Bitar KM, Zwainy NS, Bikhazi AB. Assessment of Glucagon-Like Peptide-1 Analogue and Renin Inhibitor on the Binding and Regulation of GLP-1 Receptor in Type 1 Diabetic Rat Hearts. *Exp. Diabetes Res.* 2011;2011:1–7.
315. Porrello ER, D'Amore A, Curl CL, Allen AM, Harrap SB, Thomas WG, Delbridge LMD. Angiotensin II type 2 receptor antagonizes angiotensin ii type 1 receptor-mediated cardiomyocyte autophagy. *Hypertension.* 2009;53(6):1032–1040.
316. Duan H, Li Y, Yan L, Yang H, Wu J, Qian P, Li B, Wang S. Rcan1-1L overexpression induces mitochondrial autophagy and improves cell survival in angiotensin II-exposed cardiomyocytes. *Exp. Cell Res.* 2015;335(1):99–106.
317. Lang CC, Struthers AD. Targeting the renin–angiotensin–aldosterone system in heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.* 2013;10(3):125–134.
318. Malhotra R, Sadoshima J, Brosius FC, Izumo S. Mechanical stretch and angiotensin II differentially upregulate the renin-angiotensin system in cardiac myocytes In vitro. *Circ. Res.* 1999;85(2):137–146.
319. Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ. Res.* 1993;73(3):413–423.
320. Whaley-Connell A, Habibi J, Rehmer N, Ardhanari S, Hayden MR, Pulakat L, Krueger C, Ferrario CM, DeMarco VG, Sowers JR. Renin Inhibition and AT1R blockade improve metabolic signaling, oxidant stress and myocardial tissue remodeling. *Metabolism.* 2013;62(6):861–872.
321. Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart: role of oxidative stress. *Am. J. Pathol.* 2002;161(5):1773–1781.
322. Araujo CM, Hermidorff MM, Amancio G de CS, Lemos D da S, Silva ME, de Assis LVM, Isoldi MC. Rapid effects of aldosterone in primary cultures of cardiomyocytes – do they suggest the existence of a membrane-bound receptor? *J. Recept. Signal Transduct.* 2016;36(5):435–444.
323. Somanna NK, Yarishwamy M, Garagliano JM, Siebenlist U, Mummidi S, Valente AJ,

- Chandrasekar B. Aldosterone-induced cardiomyocyte growth, and fibroblast migration and proliferation are mediated by TRAF3IP2. *Cell. Signal.* 2015;27(10):1928–1938.
324. Watanabe R, Suzuki J-I, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Isobe M. Angiotensin II receptor blocker irbesartan attenuates cardiac dysfunction induced by myocardial infarction in the presence of renal failure. *Hypertens. Res.* 2016;39(4):237–244.
 325. Wei-Ting C, Zhih-Cherng C, Juei-Tang C. OS 05-08 ELMISARTAN IMPROVES CARDIAC FIBROSIS IN DIABETES THROUGH PPAR δ /STAT3 PATHWAY—FROM BEDSIDE TO BENCH. *J. Hypertens.* 2016;34:e60.
 326. Machackova J, Liu X, Lukas A, Dhalla NS. Renin-angiotensin blockade attenuates cardiac myofibrillar remodelling in chronic diabetes. *Mol. Cell. Biochem.* 2004;261(1):271–278.
 327. Zhang H, Wu S, Huang C, Li X. Long-term treatment of spontaneously hypertensive rats with losartan and molecular basis of modulating Ito of ventricular myocytes. *Mol. Med. Rep.* 2014;9(5):1959–1967.
 328. Ozdemir S, Ugur M, Gürdal H, Turan B. Treatment with AT1 receptor blocker restores diabetes-induced alterations in intracellular Ca²⁺ transients and contractile function of rat myocardium. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005;435(1):166–174.
 329. Tanno T, Tomita H, Narita I, Kinjo T, Nishizaki K, Ichikawa H, Kimura Y, Tanaka M, Osanai T, Okumura K. Olmesartan Inhibits Cardiac Hypertrophy in Mice Overexpressing Renin Independently of Blood Pressure: Its Beneficial Effects on ACE2/Ang(1-7)/Mas Axis and NADPH Oxidase Expression. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2016;67(6):503–509.
 330. Wan W, Jiang X, Li X, Zhang C, Yi X. Silencing of angiotensin-converting enzyme by RNA interference prevents H9c2 cardiomyocytes from apoptosis induced by anoxia/reoxygenation through regulation of the intracellular renin-angiotensin system. *Int. J. Mol. Med.* 2013;32(6):1380–1386.
 331. Laszlo R, Eick C, Rueb N, Weretka S, Weig HJ, Schreieck J, Bosch RF. Inhibition of the renin-angiotensin system: effects on tachycardia-induced early electrical remodelling in rabbit atrium. *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone. Syst.* 2008;9(3):125–132.
 332. Iravanian S, Sovari AA, Lardin HA, Liu H, Xiao HD, Dolmatova E, Jiao Z, Harris BS, Witham EA, Gourdie RG, Duffy HS, Bernstein KE, Dudley SC. Inhibition of renin-angiotensin system (RAS) reduces ventricular tachycardia risk by altering connexin43. *J. Mol. Med.* 2011;89(7):677–687.
 333. Lavall D, Selzer C, Schuster P, Lenski M, Adam O, Schäfers HJ, Böhm M, Laufs U. The mineralocorticoid receptor promotes fibrotic remodeling in atrial fibrillation. *J. Biol. Chem.* 2014;289(10):6656–6668.
 334. Zhao H, Gu DW, Li HT, Ge QF, Li GP. Inhibitory effects of spironolactone on myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Genet. Mol. Res.* 2015;14(3):10315–10321.
 335. Massiera F, Seydoux J, Geloën A, Quignard-Boulange A, Turban S, Saint-Marc P,

- Fukamizu A, Negrel R, Ailhaud G, Teboul M. Angiotensinogen-Deficient Mice Exhibit Impairment of Diet-Induced Weight Gain with Alteration in Adipose Tissue Development and Increased Locomotor Activity. *Endocrinology*. 2001;142(12):5220–5225.
336. Ren L, Li Y, Li Y, Tang R, Hu D, Sheng Z, Liu N. The inhibitory effects of rosiglitazone on cardiac hypertrophy through modulating the renin-angiotensin system in diet-induced hypercholesterolemic rats. *Cell Biochem. Funct.* 2010;28(1):58–65.
 337. Ramírez E, Klett-Mingo M, Ares-Carrasco S, Picatoste B, Ferrarini A, Rupérez FJ, Caro-Vadillo A, Barbas C, Egido J, Tuñón J, Lorenzo Ó. Eplerenone attenuated cardiac steatosis, apoptosis and diastolic dysfunction in experimental type-II diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.* 2013;12(1):172.
 338. Toblli JE, Cao G, Rivas C, DeRosa G, Domecq P. Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces lipid deposits in myocardium and improves left ventricular function of obese Zucker rats. *Obesity*. 2006;14(9):1586–1595.
 339. Boschmann M, Ringel J, Klaus S, Sharma AM. Metabolic and Hemodynamic Response of Adipose Tissue to Angiotensin II. *Obes. Res.* 2001;9(8):486–491.
 340. Jayasooriya AP, Mathai ML, Walker LL, Begg DP, Denton DA, Cameron-Smith D, Egan GF, McKinley MJ, Rodger PD, Sinclair AJ, Wark JD, Weisinger HS, Jois M, Weisinger RS. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have increased energy expenditure, with reduced fat mass and improved glucose clearance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008;105(18):6531–6536.
 341. Iwai M, Kanno H, Tomono Y, Inaba S, Senba I, Furuno M, Mogi M, Horiuchi M. Direct renin inhibition improved insulin resistance and adipose tissue dysfunction in type 2 diabetic KK-Ay mice. *J. Hypertens.* 2010;28(7):1471–1481.
 342. Sui Y, Zhao H-L, Fan R-R, Guan J, He L, Lee HM, Chan JCN, Tong PCY. Renin-angiotensin system activation in renal adipogenesis. *AJP Ren. Physiol.* 2010;298(2):F391–F400.
 343. Jones BH, Standridge MK, Moustaid N. Angiotensin II Increases Lipogenesis in 3T3-L1 and Human Adipose Cells 1. *Endocrinology*. 1997;138(4):1512–1519.
 344. Gratzke P, Boschmann M, Dechend R, Qadri F, Malchow J, Graeske S, Engeli S, Janke J, Springer J, Contrepas A, Plehm R, Klaus S, Nguyen G, Luft FC, Muller DN. Energy Metabolism in Human Renin-Gene Transgenic Rats: Does Renin Contribute to Obesity? *Hypertension*. 2009;53(3):516–523.
 345. Schwenk RW, Dirx E, Coumans WA, Bonen A, Klip A, Glatz JFC, Luiken JJFP. Requirement for distinct vesicle-associated membrane proteins in insulin- and AMP-activated protein kinase (AMPK)-induced translocation of GLUT4 and CD36 in cultured cardiomyocytes. *Diabetologia*. 2010;53(10):2209–2219.
 346. Steinbusch LKM, Schwenk RW, Ouwers DM, Diamant M, Glatz JFC, Luiken JJFP. Subcellular trafficking of the substrate transporters GLUT4 and CD36 in cardiomyocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011;68(15):2525–38.
 347. Coort SLM, Bonen A, van der Vusse GJ, Glatz JFC, Luiken JJFP. Cardiac substrate uptake and metabolism in obesity and type-2 diabetes: Role of sarcolemmal

- substrate transporters. *Mol. Cell. Biochem.* 2007;299(1–2):5–18.
348. Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J. Clin. Invest.* 2000;105(8):1049–1056.
 349. Hajri T, Han XX, Bonen A, Abumrad NA. Defective fatty acid uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to diet in CD36-null mice. *J. Clin. Invest.* 2002;109(10):1381–1389.
 350. Khairallah RJ, Khairallah M, Gélinas R, Bouchard B, Young ME, Allen BG, Lopaschuk GD, Deschepper CF, Des Rosiers C. Cyclic GMP signaling in cardiomyocytes modulates fatty acid trafficking and prevents triglyceride accumulation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2008;45(2):230–239.
 351. Arumugam S, Sreedhar R, Thandavarayan RA, Karuppagounder V, Watanabe K. Targeting fatty acid metabolism in heart failure: Is it a suitable therapeutic approach? *Drug Discov. Today.* 2016;21(6):1003–1008.
 352. Hunter WG, Kelly JP, McGarrah RW, Kraus WE, Shah SH. Metabolic Dysfunction in Heart Failure: Diagnostic, Prognostic, and Pathophysiologic Insights From Metabolomic Profiling. *Curr. Heart Fail. Rep.* 2016;13(3):119–131.
 353. Marcinkiewicz-Siemion M, Ciborowski M, Kretowski A, Musial WJ, Kaminski KA. Metabolomics - A wide-open door to personalized treatment in chronic heart failure? *Int. J. Cardiol.* 2016;219:156–163.
 354. Glatz JFC, Bonen A, Ouwens DM, Luiken JJFP. Regulation of Sarcolemmal Transport of Substrates in the Healthy and Diseased Heart. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2006;20(6):471–476.
 355. Reynet C, Kahn CR. Rad: a member of the Ras family overexpressed in muscle of type II diabetic humans. *Science.* 1993;262(5138):1441–1444.
 356. Moyers JS, Bilan PJ, Reynet C, Kahn CR. Overexpression of Rad inhibits glucose uptake in cultured muscle and fat cells. *J. Biol. Chem.* 1996;271(38):23111–23116.
 357. Halter B, Gonzalez de Aguilar J-L, Rene F, Petri S, Fricker B, Echaniz-Laguna A, Dupuis L, Larmet Y, Loeffler J-P. Oxidative stress in skeletal muscle stimulates early expression of Rad in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* 2010;48(7):915–923.
 358. Ilany J, Bilan PJ, Kapur S, Caldwell JS, Patti M-E, Marette A, Kahn CR. Overexpression of Rad in muscle worsens diet-induced insulin resistance and glucose intolerance and lowers plasma triglyceride level. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006;103(12):4481–4486.
 359. Planavila A, Laguna JC, Vazquez-Carrera M. Nuclear Factor- κ B Activation Leads to Down-regulation of Fatty Acid Oxidation during Cardiac Hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 2005;280(17):17464–17471.
 360. Zhao G, Jeoung NH, Burgess SC, Rosaaen-Stowe KA, Inagaki T, Latif S, Shelton JM, McAnally J, Bassel-Duby R, Harris RA, Richardson JA, Klierer SA. Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in heart perturbs metabolism

- and exacerbates calcineurin-induced cardiomyopathy. *AJP Hear. Circ. Physiol.* 2008;294(2):H936–H943.
361. Smith EM, Zhang Y, Baye TM, Gawrich S, Cole R, Blangero J, Carless MA, Curran JE, Dyer TD, Abraham LJ, Moses EK, Kissebah AH, Martin LJ, Olivier M. INSIG1 influences obesity-related hypertriglyceridemia in humans. *J. Lipid Res.* 2010;51(4):701–708.
 362. Ma KL, Varghese Z, Ku Y, Powis SH, Chen Y, Moorhead JF, Ruan XZ. Sirolimus inhibits endogenous cholesterol synthesis induced by inflammatory stress in human vascular smooth muscle cells. *AJP Hear. Circ. Physiol.* 2010;298(6):H1646–H1651.
 363. Ka S-O, Kim K-A, Kwon K-B, Park J-W, Park B-H. Silibinin attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes through a potential upregulation of the insig pathway. *Int. J. Mol. Med.* 2009;23(5):633–637.
 364. Qin X, Xie X, Fan Y, Tian J, Guan Y, Wang X, Zhu Y, Wang N. Peroxisome proliferator-activated receptor- δ induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice. *Hepatology.* 2008;48(2):432–441.
 365. Engelking LJ. Schoenheimer effect explained - feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins. *J. Clin. Invest.* 2005;115(9):2489–2498.
 366. Nakamura T, Sato E, Amaha M, Kawagoe Y, Maeda S, Yamagishi S. Addition of aliskiren to olmesartan ameliorates tubular injury in chronic kidney disease patients partly by reducing proteinuria. *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone. Syst.* 2012;13(1):122–127.
 367. Jiang W, Zhu J, Zhuang X, Zhang X, Luo T, Esser KA, Ren H. Lipin1 Regulates Skeletal Muscle Differentiation through Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) Activation and Cyclin D Complex-regulated Cell Cycle Withdrawal. *J. Biol. Chem.* 2015;290(39):23646–23655.
 368. Hamel Y, Mamoune A, Mauvais F-X, Habarou F, Lallement L, Romero NB, Ottolenghi C, de Lonlay P. Acute rhabdomyolysis and inflammation. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2015;38(4):621–628.
 369. Mitra MS, Schilling JD, Wang X, Jay PY, Huss JM, Su X, Finck BN. Cardiac lipin 1 expression is regulated by the peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator 1 α /estrogen related receptor axis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2011;51(1):120–128.
 370. Csaki LS, Dwyer JR, Fong LG, Tontonoz P, Young SG, Reue K. Lipins, lipinopathies, and the modulation of cellular lipid storage and signaling. *Prog. Lipid Res.* 2013;52(3):305–316.
 371. Kok BPC, Kienesberger PC, Dyck JRB, Brindley DN. Relationship of glucose and oleate metabolism to cardiac function in lipin-1 deficient (fld) mice. *J. Lipid Res.* 2012;53(1):105–118.
 372. Miranda M, Escote X, Alcaide MJ, Solano E, Ceperuelo-Mallafre V, Hernandez P, Wabitsch M, Vendrell JJ. LPIN1 in human visceral and subcutaneous adipose tissue: similar levels but different associations with lipogenic and lipolytic genes. *AJP Endocrinol. Metab.* 2010;299(2):E308–E317.

373. Burgdorf C, Hänsel L, Heidbreder M, Jöhren O, Schütte F, Schunkert H, Kurz T. Suppression of cardiac phosphatidate phosphohydrolase 1 activity and lipin mRNA expression in Zucker diabetic fatty rats and humans with type 2 diabetes mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;390(1):165–170.
374. Georgescu SP, Li JH, Lu Q, Karas RH, Brown M, Mendelsohn ME. Modulator Recognition Factor 1, an AT-Rich Interaction Domain Family Member, Is a Novel Corepressor for Estrogen Receptor α . *Mol. Endocrinol.* 2005;19(10):2491–2501.
375. Zaman MM-U, Masuda K, Nyati KK, Dubey PK, Ripley B, Wang K, Chalise JP, Higa M, Hanieh H, Kishimoto T. Arid5a exacerbates IFN- γ -mediated septic shock by stabilizing T-bet mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016;201613307.
376. van der Vusse GJ, van Bilsen M, Glatz JF. Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. *Cardiovasc. Res.* 2000;45(2):279–293.
377. Nussberger J, Aubert J-F, Bouzourene K, Pellegrin M, Hayoz D, Mazzolai L. Renin Inhibition by Aliskiren Prevents Atherosclerosis Progression: Comparison With Irbesartan, Atenolol, and Amlodipine. *Hypertension.* 2008;51(5):1306–1311.
378. Fernandes V, Santos MJ, Pérez A. Statin-related myotoxicity. *Endocrinol. y Nutr.* 2016;63(5):239–249.
379. Vilahur G, Casani L, Peña E, Juan-Babot O, Mendieta G, Crespo J, Badimon L. HMG-CoA reductase inhibition prior reperfusion improves reparative fibrosis post-myocardial infarction in a preclinical experimental model. *Int. J. Cardiol.* 2014;175(3):528–538.
380. Padró T, Lugano R, García-Arguinzonis M, Badimon L. LDL-Induced Impairment of Human Vascular Smooth Muscle Cells Repair Function Is Reversed by HMG-CoA Reductase Inhibition. Aikawa E, ed. *PLoS One.* 2012;7(6):e38935.
381. Wang HJ, Park JY, Kwon O, Choe EY, Kim CH, Hur KY, Lee M-S, Yun M, Cha BS, Kim Y-B, Lee H, Kang ES. Chronic HMGCR/HMG-CoA reductase inhibitor treatment contributes to dysglycemia by upregulating hepatic gluconeogenesis through autophagy induction. *Autophagy.* 2015;11(11):2089–2101.
382. Swerdlow DI, Preiss D, Kuchenbaecker KB, Holmes M V, Engmann JEL, Shah T, Sofat R, Stender S, Johnson PCD, Scott RA, Leusink M, Verweij N, Sharp SJ, Guo Y, Giambartolomei C, et al. HMG-coenzyme A reductase inhibition, type 2 diabetes, and bodyweight: evidence from genetic analysis and randomised trials. *Lancet.* 2015;385(9965):351–361.
383. Qi X-F, Zheng L, Lee K-J, Kim D-H, Kim C-S, Cai D-Q, Wu Z, Qin J-W, Yu Y-H, Kim S-K. HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis of lymphoma cells by promoting ROS generation and regulating Akt, Erk and p38 signals via suppression of mevalonate pathway. *Cell Death Dis.* 2013;4(2):e518.
384. Gadbut AP. Induction of the cholesterol metabolic pathway regulates the farnesylation of RAS in embryonic chick heart cells: a new role for Ras in regulating the expression of muscarinic receptors and G proteins. *EMBO J.* 1997;16(24):7250–7260.
385. Tsujikawa H, Song Y, Watanabe M, Masumiya H, Gupte SA, Ochi R, Okada T.

- Cholesterol depletion modulates basal L-type Ca^{2+} current and abolishes its -adrenergic enhancement in ventricular myocytes. *AJP Hear. Circ. Physiol.* 2007;294(1):H285–H292.
386. Purcell NH, Wilkins BJ, York A, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Robbins J, Molkenstein JD. Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007;104(35):14074–14079.
 387. Daniels A, van Bilsen M, Goldschmeding R, van der Vusse GJ, van Nieuwenhoven FA. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis. *Acta Physiol.* 2009;195(3):321–338.
 388. Wu C-K, Wang Y-C, Lee J-K, Chang S-N, Su M-Y, Yeh H-M, Su M-J, Chen J-J, Chiang F-T, Hwang J-J, Lin J-L, Tsai C-T. Connective tissue growth factor and cardiac diastolic dysfunction: human data from the Taiwan Diastolic Heart Failure Registry and molecular basis by cellular and animal models. *Eur. J. Heart Fail.* 2014;16(2):163–172.
 389. Singh VP, Le B, Bhat VB, Baker KM, Kumar R. High-glucose-induced regulation of intracellular ANG II synthesis and nuclear redistribution in cardiac myocytes. *AJP Hear. Circ. Physiol.* 2007;293(2):H939–H948.
 390. Tsai C-T, Lai L-P, Hwang J-J, Chen W-P, Chiang F-T, Hsu K-L, Tseng C-D, Tseng Y-Z, Lin J-L. Renin–angiotensin system component expression in the HL-1 atrial cell line and in a pig model of atrial fibrillation. *J. Hypertens.* 2008;26(3):570–582.
 391. De Mello WC. Intracellular angiotensin II disrupts chemical communication and impairs metabolic cooperation between cardiac myocytes. *Peptides.* 2015.
 392. De Mello WC. Chemical Communication between Heart Cells is Disrupted by Intracellular Renin and Angiotensin II: Implications for Heart Development and Disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2015;6:72.
 393. Saris JJ, Derkx FHM, Lamers MJ, Saxena PR, Schalekamp MADH, Danser AHJ. Cardiomyocytes Bind and Activate Native Human Prorenin: Role of Soluble Mannose 6-Phosphate Receptors. *Hypertension.* 2001;37(2):710–715.
 394. Huang J, Siragy HM. Regulation of (Pro)Renin Receptor Expression by Glucose-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase, Nuclear Factor- κB , and Activator Protein-1 Signaling Pathways. *Endocrinology.* 2010;151(7):3317–3325.
 395. Burckle CA, Jan Danser AH, Muller DN, Garrelds IM, Gasc J-M, Popova E, Plehm R, Peters J, Bader M, Nguyen G. Elevated Blood Pressure and Heart Rate in Human Renin Receptor Transgenic Rats. *Hypertension.* 2006;47(3):552–556.
 396. Nussberger J, Wuerzner G, Jensen C, Brunner HR. Angiotensin II suppression in humans by the orally active renin inhibitor Aliskiren (SPP100): comparison with enalapril. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979).* 2002;39(1):E1–E8.
 397. Israili ZH, Velasco M, Bermúdez V. Direct Renin Inhibitors as Antihypertensive Agents. *Am. J. Ther.* 2010;17(3):237–254.
 398. Schefe JH, Neumann C, Goebel M, Danser J, Kirsch S, Gust R, Kintscher U, Unger T, Funke-Kaiser H. Prorenin engages the (pro)renin receptor like renin and both

- ligand activities are unopposed by aliskiren. *J. Hypertens.* 2008;26(9):1787–1794.
399. van Kesteren CAM, Danser AHJ, Derkx FHM, Dekkers DHW, Lamers MJM, Saxena PR, Schalekamp MADH. Mannose 6-Phosphate Receptor Mediated Internalization and Activation of Prorenin by Cardiac Cells. *Hypertension.* 1997;30(6):1389–1396.
 400. Saris JJ, van den Eijnden MMED, Lamers MJM, Saxena PR, Schalekamp MADH, Danser AHJ. Prorenin-induced myocyte proliferation: no role for intracellular angiotensin II. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979).* 2002;39(2 Pt 2):573–577.
 401. Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer J-D. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J. Clin. Invest.* 2002;109(11):1417–1427.
 402. Clausmeyer S, Reinecke A, Farrenkopf R, Unger T, Peters J. Tissue-Specific Expression of a Rat Renin Transcript Lacking the Coding Sequence for the Prefragment and Its Stimulation by Myocardial Infarction 1. *Endocrinology.* 2000;141(8):2963–2970.
 403. Bogazzi F, Raggi F, Ultimieri F, Russo D, D'Alessio A, Manariti A, Brogioni S, Manetti L, Martino E. Regulation of cardiac fatty acids metabolism in transgenic mice overexpressing bovine GH. *J. Endocrinol.* 2009;201(3):419–427.
 404. Turcotte LP, Raney MA, Todd MK. ERK1/2 inhibition prevents contraction-induced increase in plasma membrane FAT/CD36 content and FA uptake in rodent muscle. *Acta Physiol. Scand.* 2005;184(2):131–139.
 405. Feng B, Zhang T, Xu H. Human adipose dynamics and metabolic health. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2013;1281:160–77.
 406. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng Y-H, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* 2009;360(15):1509–17.
 407. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007;293(2):E444–52.
 408. Gilsanz V, Hu HH, Kajimura S. Relevance of brown adipose tissue in infancy and adolescence. *Pediatr. Res.* 2013;73(1):3–9.
 409. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 2004;84(1):277–359.
 410. McKay RM, McKay JP, Avery L, Graff JM. *C. elegans*: A model for exploring the genetics of fat storage. *Dev. Cell.* 2003;4(1):131–142.
 411. Harwood HJ. The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology.* 2012;63(1):57–75.
 412. Badoud F, Perreault M, Zulyniak M a., Mutch DM. Molecular insights into the role of white adipose tissue in metabolically unhealthy normal weight and metabolically healthy obese individuals. *FASEB J.* 2014;29(3):748–758.
 413. Cusi K. The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2

- diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 2010;10(4):306–315.
414. Khan M, Joseph F. Adipose tissue and adipokines: the association with and application of adipokines in obesity. *Scientifica (Cairo)*. 2014;2014:328592.
 415. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 2003;14(6):561–566.
 416. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ. Res.* 2005;96(9):939–949.
 417. Lago F, Gómez R, Gómez-Reino JJ, Dieguez C, Gualillo O. Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 2009;34(10):500–510.
 418. Adamczak M, Wiecek A, Wolf G. The adipose tissue as an endocrine organ. *Semin. Nephrol.* 2013;33(1):2–13.
 419. Leal V de O, Mafra D. Adipokines in obesity. *Clin. Chim. Acta.* 2013;419:87–94.
 420. Mårin P, Andersson B, Ottosson M, Olbe L, Chowdhury B, Kvist H, Holm G, Sjöström L, Björntorp P. The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism.* 1992;41(11):1242–8.
 421. Lihn AS, Bruun JM, He G, Pedersen SB, Jensen PF, Richelsen B. Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2004;219(1–2):9–15.
 422. Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, Maurovich-Horvat P, Larson MG, Keaney JF, Meigs JB, Lipinska I, Kathiresan S, Murabito JM, O'Donnell CJ, Benjamin EJ, Fox CS. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2007;116(11):1234–41.
 423. Arner P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann. Med.* 1995;27(4):435–8.
 424. Ma X, Lee P, Chisholm DJ, James DE. Control of adipocyte differentiation in different fat depots; implications for pathophysiology or therapy. *Front Endocrinol.* 2015;6(January):1.
 425. Gustafson B, Smith U. Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk. *Atherosclerosis.* 2015;241(1):27–35.
 426. Marchington JM, Mattacks CA, Pond CM. Adipose tissue in the mammalian heart and pericardium: structure, foetal development and biochemical properties. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 1989;94(2):225–32.
 427. Iozzo P. Myocardial, perivascular, and epicardial fat. *Diabetes Care.* 2011;34 Suppl 2:S371–9.
 428. Lee HY, Després JP, Koh KK. Perivascular adipose tissue in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2013;230(2):177–184.
 429. Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, Mannion JD, Diehl JT, Arafat H, Sarov-Blat L, O'Brien S, Keiper EA, Johnson AG, Martin J, Goldstein BJ, Shi Y. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation.*

- 2003;108(20):2460–6.
430. Zha JM, Di WJ, Zhu T, Xie Y, Yu J, Liu J, Chen P, Ding G. Comparison of gene transcription between subcutaneous and visceral adipose tissue in Chinese adults. *Endocr. J.* 2009;56(8):935–44.
 431. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology.* 2004;145(5):2273–82.
 432. Arounleut P, Bowser M, Upadhyay S, Shi X-M, Fulzele S, Johnson MH, Stranahan AM, Hill WD, Isaacs CM, Hamrick MW. Absence of functional leptin receptor isoforms in the POUND (Lepr(db/lb)) mouse is associated with muscle atrophy and altered myoblast proliferation and differentiation. *PLoS One.* 2013;8(8):e72330.
 433. Kwon H, Pessin JE. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2013;4:71.
 434. de Ferranti S, Mozaffarian D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin. Chem.* 2008;54(6):945–55.
 435. Xibillé-Friedmann D-X, Ortiz-Panozo E, Bustos Rivera-Bahena C, Sandoval-Ríos M, Hernández-Góngora S-E, Dominguez-Hernandez L. Leptin and adiponectin as predictors of disease activity in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2015.
 436. Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzmán M, Brownlee M. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J. Biol. Chem.* 2001;276(27):25096–100.
 437. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J.* 1999;13(10):1231–8.
 438. Sierra-Johnson J, Romero-Corral A, Lopez-Jimenez F, Gami AS, Sert Kuniyoshi FH, Wolk R, Somers VK. Relation of increased leptin concentrations to history of myocardial infarction and stroke in the United States population. *Am. J. Cardiol.* 2007;100(2):234–9.
 439. Jackson MB, Ahima RS. Neuroendocrine and metabolic effects of adipocyte-derived hormones. *Clin. Sci. (Lond).* 2006;110(2):143–52.
 440. DeClercq V, Enns J, Yeganeh A, Taylor C, Zahradka P. Modulation of Cardiovascular Function by Adipokines. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Targets.* 2013;13(1):59–72.
 441. Piñeiro R, Iglesias MJ, Gallego R, Raghay K, Eiras S, Rubio J, Diéguez C, Gualillo O, González-Juanatey JR, Lago F. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 2005;579(23):5163–5169.
 442. Piya MK, McTernan PG, Kumar S. Adipokine inflammation and insulin resistance: the role of glucose, lipids and endotoxin. *J. Endocrinol.* 2013;216(1):T1–T15.
 443. Rasouli N, Kern PA. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008;93(11 Suppl 1):S64–73.

444. Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard J-P. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab.* 2008;34(1):2–11.
445. Saddi-Rosa P, Oliveira CS V, Giuffrida FMA, Reis AF. Visfatin, glucose metabolism and vascular disease: a review of evidence. *Diabetol. Metab. Syndr.* 2010;2:21.
446. Falcão-Pires I, Castro-Chaves P, Miranda-Silva D, Lourenço AP, Leite-Moreira AF. Physiological, pathological and potential therapeutic roles of adipokines. *Drug Discov. Today.* 2012;17(15–16):880–9.
447. Yamawaki H, Hara N, Okada M, Hara Y. Visfatin causes endothelium-dependent relaxation in isolated blood vessels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;383(4):503–8.
448. Poulos SP, Hausman DB, Hausman GJ. The development and endocrine functions of adipose tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010;323(1):20–34.
449. Raucci R, Rusolo F, Sharma A, Colonna G, Castello G, Costantini S. Functional and structural features of adipokine family. *Cytokine.* 2013;61(1):1–14.
450. Vykoukal D, Davies MG. Vascular biology of metabolic syndrome. *J. Vasc. Surg.* 2011;54(3):819–31.
451. Gil-Campos M, Aguilera CM, Cañete R, Gil A. Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. *Br. J. Nutr.* 2006;96(2):201–26.
452. Iglesias MJ, Piñeiro R, Blanco M, Gallego R, Diéguez C, Gualillo O, González-Juanatey JR, Lago F. Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 2004;62(3):481–488.
453. González-Juanatey JR, Paz FL, Eiras S, Teijeira-Fernández E. Adipocitocinas como nuevos marcadores de la enfermedad cardiovascular. Perspectivas fisiopatológicas y clínicas. *Rev. Española Cardiol.* 2009;62(Supl.2):9–16.
454. Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, Hayashi Y, Kangawa K. *Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers.*; 2001.
455. Freeman JN, Carmo JM do, Adi AH, da Silva AA. Chronic central ghrelin infusion reduces blood pressure and heart rate despite increasing appetite and promoting weight gain in normotensive and hypertensive rats. *Peptides.* 2013;42:35–42.
456. Nagaya N, Miyatake K, Uematsu M, Oya H, Shimizu W, Hosoda H, Kojima M, Nakanishi N, Mori H, Kangawa K. Hemodynamic, Renal, and Hormonal Effects of Ghrelin Infusion in Patients with Chronic Heart Failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86(12):5854–5859.
457. Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Ikeda Y, Yoshihara F, Shimizu W, Hosoda H, Hirota Y, Ishida H, Mori H, Kangawa K. Chronic Administration of Ghrelin Improves Left Ventricular Dysfunction and Attenuates Development of Cardiac Cachexia in Rats With Heart Failure. *Circulation.* 2001;104(12):1430–1435.
458. Chang L, Ren Y, Liu X, Li WG, Yang J, Geng B, Weintraub NL, Tang C. Protective Effects of Ghrelin on Ischemia/Reperfusion Injury in the Isolated Rat Heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2004;43(2):165–170.
459. Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE, Tripathi G, Hallschmid M, Patel S, Kern W,

- Hillhouse EW, Lehnert H, Tan BK, Randeva HS. Identification of Nesfatin-1 in Human and Murine Adipose Tissue: A Novel Depot-Specific Adipokine with Increased Levels in Obesity. *Endocrinology*. 2010;151(7):3169–3180.
460. Stengel A, Goebel M, Yakubov I, Wang L, Witcher D, Coskun T, Taché Y, Sachs G, Lambrecht NWG. Identification and Characterization of Nesfatin-1 Immunoreactivity in Endocrine Cell Types of the Rat Gastric Oxyntic Mucosa. *Endocrinology*. 2009;150(1):232–238.
 461. Gonzalez R, Tiwari A, Unniappan S. Pancreatic beta cells colocalize insulin and pronesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;381(4):643–648.
 462. Saldanha JF, Carrero JJ, Lobo JC, Stockler-Pinto MB, Leal VO, Calixto A, Geloneze B, Mafra D. The newly identified anorexigenic adipokine nesfatin-1 in hemodialysis patients: Are there associations with food intake, body composition and inflammation? *Regul. Pept.* 2012;173(1–3):82–85.
 463. Nakata M, Manaka K, Yamamoto S, Mori M, Yada T. Nesfatin-1 enhances glucose-induced insulin secretion by promoting Ca²⁺ influx through L-type channels in mouse islet β -cells. *Endocr. J.* 2011;58(4):305–313.
 464. Vas S, Ádori C, Könczöl K, Kátai Z, Pap D, Papp RS, Bagdy G, Palkovits M, Tóth ZE. Nesfatin-1/NUCB2 as a Potential New Element of Sleep Regulation in Rats. Fisone G, ed. *PLoS One*. 2013;8(4):e59809.
 465. Merali Z, Cayer C, Kent P, Anisman H. Nesfatin-1 increases anxiety- and fear-related behaviors in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008;201(1):115–123.
 466. Angelone T, Filice E, Pasqua T, Amodio N, Galluccio M, Montesanti G, Quintieri AM, Cerra MC. Nesfatin-1 as a novel cardiac peptide: identification, functional characterization, and protection against ischemia/reperfusion injury. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013;70(3):495–509.
 467. Feijóo-Bandín S, Rodríguez-Penas D, García-Rúa V, Mosquera-Leal A, Otero MF, Pereira E, Rubio J, Martínez I, Seoane LM, Gualillo O, Calaza M, García-Caballero T, Portolés M, Roselló-Lletí E, Diéguez C, et al. Nesfatin-1 in human and murine cardiomyocytes: synthesis, secretion, and mobilization of GLUT-4. *Endocrinology*. 2013;154(12):4757–67.
 468. Stengel A. Nesfatin-1: An Affair of the Heart. *Endocrinology*. 2013;154(12):4443–4445.
 469. Fasshauer M, Blüher M, Stumvoll M. Adipokines in gestational diabetes. *lancet. Diabetes Endocrinol.* 2013;8587(13):1–12.
 470. Clerico A, Recchia FA, Passino C, Emdin M. Cardiac endocrine function is an essential component of the homeostatic regulation network: physiological and clinical implications. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006;290(1):H17–H29.
 471. Clerico A, Giannoni A, Vittorini S, Passino C. Thirty years of the heart as an endocrine organ: physiological role and clinical utility of cardiac natriuretic hormones. *AJP Hear. Circ. Physiol.* 2011;301(1):H12–H20.
 472. Ogawa T, de Bold AJ. The heart as an endocrine organ. *Endocr. Connect.* 2014;3(2):R31–R44.

473. Sengenès C, Berlan M, De Glisezinski I, Lafontan M, Galitzky J. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J.* 2000;14(10):1345–51.
474. Engeli S, Birkenfeld AL, Badin P-M, Bourlier V, Louche K, Viguerie N, Thalamas C, Montastier E, Larrouy D, Harant I, de Glisezinski I, Lieske S, Reinke J, Beckmann B, Langin D, et al. Natriuretic peptides enhance the oxidative capacity of human skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 2012;122(12):4675–9.
475. Moro C. Natriuretic peptides and fat metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2013;16(6):645–649.
476. Clerico A, Fontana M, Vittorini S, Emdin M. The search for a pathophysiological link between gender, cardiac endocrine function, body mass regulation and cardiac mortality: Proposal for a working hypothesis. *Clin. Chim. Acta.* 2009;405(1–2):1–7.
477. Krawczynska A, Olczak E, Rembiszewska A, Herman AP, Gromadzka-Ostrowska J. Time-dependent supplementation of vitamin E influences leptin expression in the aortic layers of rats fed atherogenic diet. *J. Physiol. Pharmacol.* 2014;65(1):33–39.
478. Kim S-R, Jung Y-H, Park H-J, Kim M-K, Jeong J-W, Jang H-O, Yun I, Bae S-K, Bae M-K. Upregulation of thromboxane synthase mediates visfatin-induced interleukin-8 expression and angiogenic activity in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012;418(4):662–8.
479. Ebner A, Poitz DM, Alexiou K, Deussen A. Secretion of adiponectin from mouse aorta and its role in cold storage-induced vascular dysfunction. *Basic Res. Cardiol.* 2013;108(6):390.
480. Yokomori H, Oda M, Yoshimura K, Hibi T. Enhanced expressions of apelin on proliferative hepatic arterial capillaries in human cirrhotic liver. *Hepatol. Res.* 2012;42(5):508–514.
481. Wang B-W, Lin C-M, Wu G-J, Shyu K-G. Tumor necrosis factor- α enhances hyperbaric oxygen-induced visfatin expression via JNK pathway in human coronary arterial endothelial cells. *J. Biomed. Sci.* 2011;18:27.
482. Komura N, Maeda N, Mori T, Kihara S, Nakatsuji H, Hirata A, Tochino Y, Funahashi T, Shimomura I. Adiponectin Protein Exists in Aortic Endothelial Cells. Bacurau RF, ed. *PLoS One.* 2013;8(8):e71271.
483. Beiser DG, Wang H, Li J, Wang X, Yordanova V, Das A, Mirzapoiazova T, Garcia JGNN, Stern SA, Vanden Hoek TL. Plasma and myocardial visfatin expression changes are associated with therapeutic hypothermia protection during murine hemorrhagic shock/resuscitation. *Resuscitation.* 2010;81(6):742–748.
484. Kim M, Oh JK, Sakata S, Liang I, Park W, Hajjar RJ, Lebeche D. Role of resistin in cardiac contractility and hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2008;45(2):270–280.
485. Purdham DM, Zou M-X, Rajapurohitam V, Karmazyn M. Rat heart is a site of leptin production and action. *AJP Hear. Circ. Physiol.* 2004;287(6):H2877–H2884.
486. Pei H, Qu Y, Lu X, Yu Q, Lian K, Liu P, Yan W, Liu J, Ma Y, Liu Y, Li C, Li W, Lau WB, Zhang H, Tao L. Cardiac-derived adiponectin induced by long-term insulin treatment ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in type 1

- diabetic mice via AMPK signaling. *Basic Res. Cardiol.* 2013;108(1):322.
487. Wu K. Inhibition of the leptin-induced activation of the p38 α /MAPK pathway contributes to the protective effects of naringin against high glucose-induced injury in H9c2 cardiac cells. *Int. J. Mol. Med.* 2014;33(3):605–612.
 488. Chandrasekaran B, Kalra PR, Donovan J, Hooper J, Clague JR, McDonagh TA. Myocardial Apelin Production is Reduced in Humans With Left Ventricular Systolic Dysfunction. *J. Card. Fail.* 2010;16(7):556–561.
 489. Nagpal S1, Patel S, Jacobe H, DiSepio D, Ghosn C, Malhotra M, Teng M, Duvic M CR. 1997 .pdfTarazotene-induced Gene2, A novel retinoid-responsive gene. 1997.
 490. Wittamer V, Franssen J-D, Vulcano M, Mirjolet J-F, Le Poul E, Migeotte I, Brézillon S, Tyldesley R, Blanpain C, Detheux M, Mantovani A, Sozzani S, Vassart G, Parmentier M, Communi D. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J. Exp. Med.* 2003;198(7):977–985.
 491. Samson M, Edinger a L, Stordeur P, Rucker J, Verhasselt V, Sharron M, Govaerts C, Mollereau C, Vassart G, Doms RW, Parmentier M. ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains. *Eur. J. Immunol.* 1998;28(5):1689–1700.
 492. Meder W, Wendland M, Busmann a., Kutzleb C, Spodsberg N, John H, Richter R, Schleuder D, Meyer M, Forssmann WG. Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23. *FEBS Lett.* 2003;555(3):495–499.
 493. Zabel BA, Silverio AM, Butcher EC. Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood. *J. Immunol.* 2005;174(1):244–51.
 494. Zabel B a, Allen SJ, Kulig P, Allen J a, Cichy J, Handel TM, Butcher EC. Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. *J. Biol. Chem.* 2005;280(41):34661–34666.
 495. Vermi W, Riboldi E, Wittamer V, Gentili F, Luini W, Marrelli S, Vecchi A, Franssen J-D, Communi D, Massardi L, Sironi M, Mantovani A, Parmentier M, Facchetti F, Sozzani S. Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *J. Exp. Med.* 2005;201(4):509–15.
 496. Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, Walder K, Segal D. Chemerin Is a Novel Adipokine Associated with Obesity and Metabolic Syndrome. *Endocrinology.* 2007;148(10):4687–4694.
 497. Du X-Y, Leung LLK. Proteolytic regulatory mechanism of chemerin bioactivity. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 2009;41(12):973–979.
 498. Zabel B a, Zuniga L, Ohyama T, Allen SJ, Cichy J, Handel TM, Butcher EC. Chemoattractants, extracellular proteases, and the integrated host defense response. *Exp. Hematol.* 2006;34(8):1021–1032.

499. Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman E a, Zabel B a, Butcher EC, Parlee SD, Muruganandan S, Sinal CJ. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J. Biol. Chem.* 2007;282(38):28175–28188.
500. Banas M, Zabieglo K, Kasetty G, Kapinska-Mrowiecka M, Borowczyk J, Drukala J, Murzyn K, Zabel B a, Butcher EC, Schroeder JM, Schmidtchen A, Cichy J. Chemerin is an antimicrobial agent in human epidermis. *PLoS One.* 2013;8(3):e58709.
501. Luangsay S, Wittamer V, Bondue B, De Henau O, Rouger L, Brait M, Franssen J-D, de Nadai P, Huaux F, Parmentier M. Mouse ChemR23 Is Expressed in Dendritic Cell Subsets and Macrophages, and Mediates an Anti-Inflammatory Activity of Chemerin in a Lung Disease Model. *J. Immunol.* 2009;183(10):6489–6499.
502. Issa ME, Muruganandan S, Ernst MC, Parlee SD, Zabel BA, Butcher EC, Sinal CJ, Goralski KB. Chemokine-like receptor 1 regulates skeletal muscle cell myogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2012;302(11):C1621-31.
503. Zabel B a, Kwitniewski M, Banas M, Zabieglo K, Murzyn K, Cichy J. Chemerin regulation and role in host defense. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* 2014;3(1):1–19.
504. Sell H, Laurencikiene J, Taube A, Eckardt K, Cramer A, Horrigths A, Arner P, Eckel J. Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes.* 2009;58(12):2731–2740.
505. Adams AE, Abu-Amer Y, Chappel J, Stueckle S, Ross FP, Teitelbaum SL, Suva LJ. 1,25 dihydroxyvitamin D3 and dexamethasone induce the cyclooxygenase 1 gene in osteoclast-supporting stromal cells. *J. Cell. Biochem.* 1999;74(4):587–95.
506. Maheshwari A, Kurundkar AR, Shaik SS, Kelly DR, Hartman Y, Zhang W, Dimmitt R, Saeed S, Randolph DA, Aprahamian C, Datta G, Ohls RK. Epithelial cells in fetal intestine produce chemerin to recruit macrophages. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2009;297(1):G1–G10.
507. Tan BK, Chen J, Farhatullah S, Adya R, Kaur J, Heutling D, Lewandowski KC, O'Hare JP, Lehnert H, Randeve HS. Insulin and metformin regulate circulating and adipose tissue chemerin. *Diabetes.* 2009;58(9):1971–7.
508. De Palma G, Castellano G, Del Prete A, Sozzani S, Fiore N, Loverre A, Parmentier M, Gesualdo L, Grandaliano G, Schena FP. The possible role of ChemR23/Chemerin axis in the recruitment of dendritic cells in lupus nephritis. *Kidney Int.* 2011;79(11):1228–1235.
509. Conde J, Gomez R, Bianco G, Scotece M, Lear P, Dieguez C, Gomez-Reino J, Lago F, Gualillo O. Expanding the adipokine network in cartilage: identification and regulation of novel factors in human and murine chondrocytes. *Ann. Rheum. Dis.* 2011;70(3):551–559.
510. Bauer S, Wanninger J, Schmidhofer S, Weigert J, Neumeier M, Dorn C, Hellerbrand C, Zimara N, Schäffler A, Aslanidis C, Buechler C. Sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) activation after excess triglyceride storage induces chemerin in hypertrophic adipocytes. *Endocrinology.* 2011;152(1):26–35.
511. Roh S, Song S-H, Choi K-C, Katoh K, Wittamer V, Parmentier M, Sasaki S. Chemerin--a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;362(4):1013–8.

512. Muruganandan S, Parlee SD, Rourke JL, Ernst MC, Goralski KB, Sinal CJ. Chemerin, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) target gene that promotes mesenchymal stem cell adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 2011;286(27):23982–95.
513. Kralisch S, Weise S, Sommer G, Lipfert J, Lossner U, Bluher M, Stumvoll M, Fasshauer M. Interleukin-1beta induces the novel adipokine chemerin in adipocytes in vitro. *Regul. Pept.* 2009;154(1–3):102–106.
514. Parlee SD, Ernst MC, Muruganandan S, Sinal CJ, Goralski KB. Serum chemerin levels vary with time of day and are modified by obesity and tumor necrosis factor- α . *Endocrinology.* 2010;151(6):2590–2602.
515. Kaneko K, Miyabe Y, Takayasu A, Fukuda S, Miyabe C, Ebisawa M, Yokoyama W, Watanabe K, Imai T, Muramoto K, Terashima Y, Sugihara T, Matsushima K, Miyasaka N, Nanki T. Chemerin activates fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2011;13(5):R158.
516. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 1995;83(6):835–839.
517. Das S, Schapira M, Tomic-Canic M, Goyanka R, Cardozo T, Samuels HH. Farnesyl Pyrophosphate Is a Novel Transcriptional Activator for a Subset of Nuclear Hormone Receptors. *Mol. Endocrinol.* 2007;21(11):2672–2686.
518. Yu K, Bayona W, Kallen CB, Harding HP, Ravera CP, McMahon G, Brown M, Lazar MA. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J. Biol. Chem.* 1995;270(41):23975–23983.
519. Deng Y, Wang H, Lu Y, Liu S, Zhang Q, Huang J, Zhu R, Yang J, Zhang R, Zhang D, Shen W, Ning G, Yang Y. Identification of chemerin as a novel FXR target gene down-regulated in the progression of nonalcoholic steatohepatitis. *Endocrinology.* 2013;154(5):1794–801.
520. Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 2003;72(1):137–174.
521. Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL, Shimano H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Clin. Invest.* 1998;101(11):2331–2339.
522. Lee JO, Lee SK, Jung JH, Kim JH, You GY, Kim SJ, Park SH, Uhm K-O, Kim HS. Metformin induces Rab4 through AMPK and modulates GLUT4 translocation in skeletal muscle cells. *J. Cell. Physiol.* 2011;226(4):974–981.
523. Zabel BA, Ohyama T, Zuniga L, Kim J-Y, Johnston B, Allen SJ, Guido DG, Handel TM, Butcher EC. Chemokine-like receptor 1 expression by macrophages in vivo: Regulation by TGF- β and TLR ligands. *Exp. Hematol.* 2006;34(8):1106–1114.
524. Wittamer V, Bondue B, Guillabert A, Vassart G, Parmentier M, Communi D. Neutrophil-Mediated Maturation of Chemerin: A Link between Innate and Adaptive Immunity. *J. Immunol.* 2005;175(1):487–493.

525. Zhao L, Yamaguchi Y, Sharif S, Du X-Y, Song JJ, Lee DM, Recht LD, Robinson WH, Morser J, Leung LLK. Chemerin158K protein is the dominant chemerin isoform in synovial and cerebrospinal fluids but not in plasma. *J. Biol. Chem.* 2011;286(45):39520–39527.
526. Yamaguchi Y, Du X-Y, Zhao L, Morser J, Leung LLK. Proteolytic cleavage of chemerin protein is necessary for activation to the active form, Chem157S, which functions as a signaling molecule in glioblastoma. *J. Biol. Chem.* 2011;286(45):39510–9.
527. Wittamer V, Grégoire F, Robberecht P, Vassart G, Communi D, Parmentier M. The C-terminal nonapeptide of mature chemerin activates the chemerin receptor with low nanomolar potency. *J. Biol. Chem.* 2004;279(11):9956–62.
528. Parlee SD, McNeil JO, Muruganandan S, Sinal CJ, Goralski KB. Elastase and tryptase govern TNF α -mediated production of active chemerin by adipocytes. *PLoS One.* 2012;7(12):e51072.
529. Kulig P, Kantyka T, Zabel B a, Banas M, Chyra A, Stefanska A, Tu H, Allen SJ, Handel TM, Kozik A, Potempa J, Butcher EC, Cichy J. Regulation of chemerin chemoattractant and antibacterial activity by human cysteine cathepsins. *J. Immunol.* 2011;187(3):1403–10.
530. Kulig P, Zabel BA, Dubin G, Allen SJ, Ohyama T, Potempa J, Handel TM, Butcher EC, Cichy J. Staphylococcus aureus-derived staphopain B, a potent cysteine protease activator of plasma chemerin. *J. Immunol.* 2007;178(6):3713–20.
531. Du X, Zabel BA, Myles T, Allen SJ, Handel TM, Lee PP, Butcher EC, Leung LL. Regulation of chemerin bioactivity by plasma carboxypeptidase N, carboxypeptidase B (activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor), and platelets. *J. Biol. Chem.* 2009;284(2):751–8.
532. Guillabert A, Wittamer V, Bondue B, Godot V, Imbault V, Parmentier M, Communi D. Role of neutrophil proteinase 3 and mast cell chymase in chemerin proteolytic regulation. *J. Leukoc. Biol.* 2008;84(6):1530–1538.
533. Cash JL, Hart R, Russ A, Dixon JPC, Colledge WH, Doran J, Hendrick AG, Carlton MBL, Greaves DR. Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23. *J. Exp. Med.* 2008;205(4):767–75.
534. Mattern A, Zellmann T, Beck-Sickinger AG. Processing, signaling, and physiological function of chemerin. *IUBMB Life.* 2014;66(1):19–26.
535. Barnea G, Strapps W, Herrada G, Berman Y, Ong J, Kloss B, Axel R, Lee KJ. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008;105(1):64–69.
536. Zabel BA, Nakae S, Zúñiga L, Kim J-Y, Ohyama T, Alt C, Pan J, Suto H, Soler D, Allen SJ, Handel TM, Song CH, Galli SJ, Butcher EC. Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis. *J. Exp. Med.* 2008;205(10):2207–2220.
537. Gantz I, Konda Y, Yang YK, Miller DE, Dierick HA, Yamada T. Molecular cloning of a novel receptor (CMKLR1) with homology to the chemotactic factor receptors.

- Cytogenet. Cell Genet.* 1996;74(4):286–90.
538. Owman C, Nilsson C, Lolait SJ. Cloning of cDNA Encoding a Putative Chemoattractant Receptor. *Genomics.* 1996;37(2):187–194.
 539. Ernst MC, Sinal CJ. Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. *Trends Endocrinol. Metab.* 2010;21(11):660–7.
 540. Arita M, Ohira T, Sun Y-P, Elangovan S, Chiang N, Serhan CN. Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J. Immunol.* 2007;178(6):3912–7.
 541. Yoshimura T, Oppenheim JJ. Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C-C motif) receptor-like 2 (CCRL2); two multifunctional receptors with unusual properties. *Exp. Cell Res.* 2011;317(5):674–84.
 542. Rourke JL, Muruganandan S, Dranse HJ, McMullen NM, Sinal CJ. Gpr1 is an active chemerin receptor influencing glucose homeostasis in obese mice. *J. Endocrinol.* 2014;5011(June):1–40.
 543. Fan P, Kyaw H, Su K, Zeng Z, Augustus M, Carter KC, Li Y. Cloning and characterization of a novel human chemokine receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;243(1):264–8.
 544. Monnier J, Lewén S, O'Hara E, Huang K, Tu H, Butcher EC, Zabel B a. Expression, regulation, and function of atypical chemerin receptor CCRL2 on endothelial cells. *J. Immunol.* 2012;189(2):956–67.
 545. Otero K, Vecchi A, Hirsch E, Kearley J, Vermi W, Del Prete A, Gonzalvo-Feo S, Garlanda C, Azzolino O, Salogni L, Lloyd CM, Facchetti F, Mantovani A, Sozzani S. Nonredundant role of CCRL2 in lung dendritic cell trafficking. *Blood.* 2010;116(16):2942–2949.
 546. Monnier J, Zabel B, Butcher E. Regulation of the Atypical Chemerin Receptor, CCRL2, on Activated Brain Endothelial Cells. *Clin. Immunol.* 2010;135:S63.
 547. Mariani F, Roncucci L. Chemerin/chemR23 axis in inflammation onset and resolution. *Inflamm. Res.* 2015;64(2):85–95.
 548. Ferland DJ, Watts SW. Chemerin: A comprehensive review elucidating the need for cardiovascular research. *Pharmacol. Res.* 2015;99:351–361.
 549. Braff MH, Di Nardo A, Gallo RL. Keratinocytes store the antimicrobial peptide cathelicidin in lamellar bodies. *J. Invest. Dermatol.* 2005;124(2):394–400.
 550. Parolini S, Santoro A, Marcenaro E, Luini W, Massardi L, Facchetti F, Communi D, Parmentier M, Majorana A, Sironi M, Tabellini G, Moretta A, Sozzani S. The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood.* 2007;109(9):3625–32.
 551. Hart R, Greaves DR. Chemerin Contributes to Inflammation by Promoting Macrophage Adhesion to VCAM-1 and Fibronectin through Clustering of VLA-4 and VLA-5. *J. Immunol.* 2010;185(6):3728–3739.
 552. Lőrincz H, Katkó M, Harangi M, Somodi S, Gaál K, Fülöp P, Paragh G, Seres I.

- Strong correlations between circulating chemerin levels and lipoprotein subfractions in nondiabetic obese and nonobese subjects. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2013;1–8.
553. Shin H-Y, Lee DC, Chu SH, Jeon JY, Lee MK, Im J a, Lee JW. Chemerin levels are positively correlated with abdominal visceral fat accumulation. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2012;77(1):47–50.
 554. Watts SW, Dorrance AM, Penfold ME, Rourke JL, Sinal CJ, Seitz B, Sullivan TJ, Charvat TT, Thompson JM, Burnett R, Fink GD. Chemerin connects fat to arterial contraction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2013;33(6):1320–8.
 555. Takahashi M, Takahashi Y, Takahashi K, Zolotaryov FN, Hong KS, Kitazawa R, Iida K, Okimura Y, Kaji H, Kitazawa S, Kasuga M, Chihara K. Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett.* 2008;582(5):573–8.
 556. Takahashi M, Okimura Y, Iguchi G, Nishizawa H, Yamamoto M, Suda K, Kitazawa R, Fujimoto W, Takahashi K, Zolotaryov FN, Hong KS, Kiyonari H, Abe T, Kaji H, Kitazawa S, et al. Chemerin regulates β -cell function in mice. *Sci. Rep.* 2011;1:123.
 557. Reverchon M, Cornuau M, Ramé C, Guerif F, Royère D, Dupont J. Chemerin inhibits IGF-1-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. *Hum. Reprod.* 2012;27(6):1790–800.
 558. Reverchon M, Bertoldo MJ, Ramé C, Froment P, Dupont J. CHEMERIN (RARRES2) decreases in vitro granulosa cell steroidogenesis and blocks oocyte meiotic progression in bovine species. *Biol. Reprod.* 2014;90(5):102.
 559. Stejskal D, Karpisek M, Hanulova Z, Svestak M. Chemerin is an independent marker of the metabolic syndrome in a Caucasian population--a pilot study. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palack??, Olomouc, Czechoslov.* 2008;152(2):217–221.
 560. Li Y, Shi B, Li S. Association between Serum Chemerin Concentrations and Clinical Indices in Obesity or Metabolic Syndrome: A Meta-Analysis. Villa E, ed. *PLoS One*. 2014;9(12):e113915.
 561. Chu SH, Lee MK, Ahn KY, Im J-A, Park MS, Lee D-C, Jeon JY, Lee JW. Chemerin and adiponectin contribute reciprocally to metabolic syndrome. *PLoS One*. 2012;7(4):e34710.
 562. Wang D, Yuan G-Y, Wang X-Z, Jia J, Di L-L, Yang L, Chen X, Qian F-F, Chen J-J. Plasma chemerin level in metabolic syndrome. *Genet. Mol. Res.* 2013;12(4):5986–91.
 563. Gu P, Jiang W, Lu B, Shi Z. Chemerin is associated with inflammatory markers and metabolic syndrome phenotypes in hypertension patients. *Clin. Exp. Hypertens.* 2013;1963:1–7.
 564. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001;280(5):E745–51.
 565. Cottam DR, Mattar SG, Barinas-Mitchell E, Eid G, Kuller L, Kelley DE, Schauer PR. The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes. Surg.* 2004;14(5):589–600.

566. Trayhurn P, Wood IS. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem. Soc. Trans.* 2005;33(Pt 5):1078–81.
567. Romacho T, Elsen M, Röhrborn D, Eckel J. Adipose tissue and its role in organ crosstalk. *Acta Physiol. (Oxf)*. 2014;210(4):733–53.
568. Cabia B, Andrade S, Carreira MC, Casanueva FF, Crujeiras AB. A role for novel adipose tissue-secreted factors in obesity-related carcinogenesis. *Obes. Rev.* 2016;(1):n/a-n/a.
569. Caspar-Bauguil S, Cousin B, Bour S, Castiella L, Penicaud L, Carpené C. Adipose tissue lymphocytes: types and roles. *J. Physiol. Biochem.* 2009;65(4):423–436.
570. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 2003;112(12):1796–1808.
571. Chakaroun R, Raschpichler M, Klöting N, Oberbach A, Flehmig G, Kern M, Schön MR, Shang E, Lohmann T, Dreßler M, Fasshauer M, Stumvoll M, Blüher M. Effects of weight loss and exercise on chemerin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Metabolism*. 2012;61(5):706–14.
572. Sell H, Divoux A, Poitou C, Basdevant A, Bouillot J-L, Bedossa P, Tordjman J, Eckel J, Clément K. Chemerin correlates with markers for fatty liver in morbidly obese patients and strongly decreases after weight loss induced by bariatric surgery. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010;95(6):2892–6.
573. Sun B, Karin M. Obesity, inflammation, and liver cancer. *J. Hepatol.* 2012;56(3):704–713.
574. Kukla M, Zwirska-Korczala K, Hartleb M, Waluga M, Chwist A, Kajor M, Ciupinska-Kajor M, Berdowska A, Wozniak-Grygiel E, Buldak R. Serum chemerin and vaspin in non-alcoholic fatty liver disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 2010;45(2):235–242.
575. Kłusek-Oksiuta M, Białokoz-Kalinowska I, Tarasów E, Wojtkowska M, Werpachowska I, Lebensztejn DM. Chemerin as a novel non-invasive serum marker of intrahepatic lipid content in obese children. *Ital. J. Pediatr.* 2014;40(1):84.
576. Kostopoulos CG, Spiroglou SG, Varakis JN, Apostolakis E, Papadaki HH. Chemerin and CMKLR1 expression in human arteries and periadventitial fat: a possible role for local chemerin in atherosclerosis? *BMC Cardiovasc. Disord.* 2014;14(1):56.
577. Demarco VG, Aroor AR, Sowers JR. The pathophysiology of hypertension in patients with obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2014;advance on(6):364–376.
578. Daiber A, Steven S, Weber A, Shuvaev V V, Muzykantov VR, Laher I, Li H, Lamas S, Münzel T. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br. J. Pharmacol.* 2016.
579. Sausbier M, Schubert R, Voigt V, Hirneiss C, Pfeifer A, Korth M, Kleppisch T, Ruth P, Hofmann F. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ. Res.* 2000;87(9):825–30.
580. Handa P, Tateya S, Rizzo NO, Cheng AM, Morgan-Stevenson V, Han C-Y, Clowes

- AW, Daum G, O'Brien KD, Schwartz MW, Chait A, Kim F. Reduced vascular nitric oxide-cGMP signaling contributes to adipose tissue inflammation during high-fat feeding. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31(12):2827–35.
581. Neves KB, Lobato NS, Lopes RAM, Filgueira FP, Zanotto CZ, Oliveira AM, Tostes RC. Chemerin reduces vascular nitric oxide/cGMP signalling in rat aorta: a link to vascular dysfunction in obesity? *Clin. Sci.* 2014;127(2):111–122.
 582. Pradhan AD, Manson JE, Rossouw JE, Siscovick DS, Mouton CP, Rifai N, Wallace RB, Jackson RD, Pettinger MB, Ridker PM. Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the Women's Health Initiative observational study. *JAMA.* 2002;288(8):980–7.
 583. Yamawaki H, Kameshima S, Usui T, Okada M, Hara Y. A novel adipocytokine, chemerin exerts anti-inflammatory roles in human vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012;423(1):152–157.
 584. Kaur J, Adya R, Tan BK, Chen J, Randeve HS. Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: Chemerin-induced endothelial angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;391(4):1762–1768.
 585. Bozaoglu K, Curran JE, Stocker CJ, Zaibi MS, Segal D, Konstantopoulos N, Morrison S, Carless M, Dyer TD, Cole S a, Goring HHH, Moses EK, Walder K, Cawthorne M a, Blangero J, et al. Chemerin, a novel adipokine in the regulation of angiogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010;95(5):2476–85.
 586. Dong B, Ji W, Zhang Y. Elevated Serum Chemerin Levels are Associated with the Presence of Coronary Artery Disease in Patients with Metabolic Syndrome. *Intern. Med.* 2011;50(10):1093–1097.
 587. Leiherer A, Muendlein A, Kinz E, Vonbank A, Rein P, Fraunberger P, Malin C, SAELY CH, Drexel H. High plasma chemerin is associated with renal dysfunction and predictive for cardiovascular events - Insights from phenotype and genotype characterization. *Vascul. Pharmacol.* 2015.
 588. Ji Q, Lin Y, Liang Z, Yu K, Liu Y, Fang Z, Liu L, Shi Y, Zeng Q, Chang C, Chai M, Zhou Y. Chemerin is a novel biomarker of acute coronary syndrome but not of stable angina pectoris. *Cardiovasc. Diabetol.* 2014;13(1):145.
 589. Hah Y-J, Kim N-K, Kim M-K, Kim H-S, Hur S-H, Yoon H-J, Kim Y-N, Park K-G. Relationship between Chemerin Levels and Cardiometabolic Parameters and Degree of Coronary Stenosis in Korean Patients with Coronary Artery Disease. *Diabetes Metab. J.* 2011;35(3):248–254.
 590. Yoo HJ, Choi HY, Yang SJ, Kim HY, Seo J a, Kim SG, Kim NH, Choi KM, Choi DS, Baik SH. Circulating Chemerin Level is Independently Correlated with Arterial Stiffness. *J. Atheroscler. Thromb.* 2012;19(1):59–68.
 591. Yu S, Zhang Y, Li M-Z, Xu H, Wang Q, Song J, Lin P, Zhang L, Liu Q, Huang Q-X, Wang K, Hou W-K. Chemerin and apelin are positively correlated with inflammation in obese type 2 diabetic patients. *Chin. Med. J. (Engl).* 2012;125(19):3440–4.
 592. Herová M, Schmid M, Gemperle C, Loretz C, Hersberger M. Low dose aspirin is associated with plasma chemerin levels and may reduce adipose tissue inflammation.

- Atherosclerosis*. 2014;235(2):256–262.
593. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Ramírez B, Rotellar F, Valentí V, Silva C, Gil MJ, Salvador J, Frühbeck G. Increased levels of chemerin and its receptor, chemokine-like receptor-1, in obesity are related to inflammation: tumor necrosis factor- α stimulates mRNA levels of chemerin in visceral adipocytes from obese patients. *Surg. Obes. Relat. Dis.* 2011;9(2):306–314.
 594. Landgraf K, Friebe D, Ullrich T, Kratzsch J, Dittrich K, Herberth G, Adams V, Kiess W, Erbs S, Körner A. Chemerin as a mediator between obesity and vascular inflammation in children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012;97(4):E556-64.
 595. Erdogan S, Yilmaz FM, Yazici O, Yozgat A, Sezer S, Ozdemir N, Uysal S, Purnak T, Sendur MA, Ozaslan E. Inflammation and chemerin in colorectal cancer. *Tumor Biol.* 2016;37(5):6337–6342.
 596. Bonomini M, Pandolfi A. Chemerin in renal dysfunction and cardiovascular disease. *Vascul. Pharmacol.* 2015.
 597. Pfau D, Stepan H, Kratzsch J, Verlohren M, Verlohren H-J, Drynda K, Lössner U, Blüher M, Stumvoll M, Fasshauer M. Circulating levels of the adipokine chemerin in gestational diabetes mellitus. *Horm. Res. paediatrics.* 2010;74(1):56–61.
 598. Fülöp P, Seres I, Lőrincz H, Harangi M, Somodi S, Paragh G. Association of chemerin with oxidative stress, inflammation and classical adipokines in non-diabetic obese patients. *J. Cell. Mol. Med.* 2014.
 599. Bondue B, Wittamer V, Parmentier M. Chemerin and its receptors in leukocyte trafficking, inflammation and metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22(5–6):331–8.
 600. Cash JL, Christian AR, Greaves DR. Chemerin peptides promote phagocytosis in a ChemR23- and Syk-dependent manner. *J. Immunol.* 2010;184(9):5315–24.
 601. Zhao L, Yang W, Yang X, Lin Y, Lv J, Dou X, Luo Q, Dong J, Chen Z, Chu Y, He R. Chemerin suppresses murine allergic asthma by inhibiting CCL2 production and subsequent airway recruitment of inflammatory dendritic cells. *Allergy.* 2014;69(6):763–774.
 602. Wang L, Yang T, Ding Y, Zhong Y, Yu L, Peng M. Chemerin plays a protective role by regulating human umbilical vein endothelial cell-induced nitric oxide signaling in preeclampsia. *Endocrine.* May 20, 2014:299–308.
 603. Bondue B, De Henau O, Luangsay S, Devosse T, de Nadaï P, Springael J-Y, Parmentier M, Vosters O. The chemerin/ChemR23 system does not affect the pro-inflammatory response of mouse and human macrophages ex vivo. *PLoS One.* 2012;7(6):e40043.
 604. Pohl R, Rein-Fischboeck L, Meier EM, Eisinger K, Krautbauer S, Buechler C. Resolvin E1 and chemerin C15 peptide do not improve rodent non-alcoholic steatohepatitis. *Exp. Mol. Pathol.* 2015.
 605. Iannone F, Lapadula G. Chemerin/ChemR23 pathway: a system beyond chemokines. *Arthritis Res. Ther.* 2011;13(2):104.

606. Huang K, Du G, Li L, Liang H, Zhang B. Association of chemerin levels in synovial fluid with the severity of knee osteoarthritis. *Biomarkers*. 2012;17(1):16–20.
607. Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Filarsky M, Bauer S, Wiest R, Farkas S, Scherer MN, Schäffler A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C. Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2010;72(3):342–348.
608. Lehrke M, Becker A, Greif M, Stark R, Laubender RP, von Ziegler F, Lebherz C, Tittus J, Reiser M, Becker C, Göke B, Leber AW, Parhofer KG, Broedl UC. Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis. *Eur. J. Endocrinol*. 2009;161(2):339–344.
609. Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ*. 2008;15(2):226–233.
610. Weigert J, Obermeier F, Neumeier M, Wanninger J, Filarsky M, Bauer S, Aslanidis C, Rogler G, Ott C, Schäffler A, Schölmerich J, Buechler C. Circulating levels of chemerin and adiponectin are higher in ulcerative colitis and chemerin is elevated in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis*. 2010;16(4):630–7.
611. Adrych K, Stojek M, Smoczynski M, Sledzinski T, Sylwia S-W, Swierczynski J. Increased serum chemerin concentration in patients with chronic pancreatitis. *Dig. Liver Dis*. 2012;44(5):393–7.
612. Pfau D, Bachmann A, Lössner U, Kratzsch J, Blüher M, Stumvoll M, Fasshauer M. Serum levels of the adipokine chemerin in relation to renal function. *Diabetes Care*. 2010;33(1):171–3.
613. Kumar JD, Holmberg C, Kandola S, Steele I, Hegyi P, Tiszlavicz L, Jenkins R, Beynon RJ, Peeney D, Giger OT, Alqahtani A, Wang TC, Charvat TT, Penfold M, Dockray GJ, et al. Increased Expression of Chemerin in Squamous Esophageal Cancer Myofibroblasts and Role in Recruitment of Mesenchymal Stromal Cells. *PLoS One*. 2014;9(8):e104877.
614. Kumar JD, Kandola S, Tiszlavicz L, Reisz Z, Dockray GJ, Varro A. The role of chemerin and ChemR23 in stimulating the invasion of squamous oesophageal cancer cells. *Br. J. Cancer*. 2016;114(10):1152–1159.
615. Wang C, Wu WKK, Liu X, To K-F, Chen GG, Yu J, Ng EKW. Increased serum chemerin level promotes cellular invasiveness in gastric cancer: a clinical and experimental study. *Peptides*. 2014;51:131–8.
616. Zhang J, Jin H-C, Zhu A-K, Ying R-C, Wei W, Zhang F-J. Prognostic significance of plasma chemerin levels in patients with gastric cancer. *Peptides*. 2014;61C:7–11.
617. Shen W, Tian C, Chen H, Yang Y, Zhu D, Gao P, Liu J. Oxidative stress mediates chemerin-induced autophagy in endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med*. 2013;55:73–82.
618. Aksan G, İnci S, Nar G, Soylu K, Gedikli Ö, Yüksel S, Özdemir M, Nar R, Meriç M, Şahin M. Association of serum chemerin levels with the severity of coronary artery disease in patients with metabolic syndrome. *Int. J. Clin. Exp. Med*. 2014;7(12):5461–

- 8.
619. Rourke JL, Dranse HJ, Sinal CJ. Towards an integrative approach to understanding the role of chemerin in human health and disease. *Obes. Rev.* 2013;14(3):245–262.
620. Gu P, Cheng M, Hui X, Lu B, Jiang W, Shi Z. Elevating circulation chemerin level is associated with endothelial dysfunction and early atherosclerotic changes in essential hypertensive patients. *J. Hypertens.* 2015;33(8):1624–1632.
621. Derosa G, Cicero AFG, Carbone A, Querci F, Fogari E, D'Angelo A, Maffioli P. Results from a 12 months, randomized, clinical trial comparing an olmesartan/amlodipine single pill combination to olmesartan and amlodipine monotherapies on blood pressure and inflammation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2014;51:26–33.
622. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell. Signal.* 2002;14(5):381–395.
623. Matsui T, Tao J, del Monte F, Lee KH, Li L, Picard M, Force TL, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A. Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation.* 2001;104(3):330–335.
624. Matsui T, Rosenzweig A. Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: The role of PI 3-kinase and Akt. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2005;38(1):63–71.
625. Armstrong SC. Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 2004;61(3):427–436.
626. Takatani T, Takahashi K, Uozumi Y, Matsuda T, Ito T, Schaffer SW, Fujio Y, Azuma J. Taurine prevents the ischemia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes through Akt/caspase-9 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;316(2):484–489.
627. Aikawa R, Nawano M, Gu Y, Katagiri H, Asano T, Zhu W, Nagai R, Komuro I. Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt. *Circulation.* 2000;102(23):2873–2879.
628. Xing Y, Yang D, Lu J, Dong D-L. Insulin prevents bone morphogenetic protein-4 induced cardiomyocyte apoptosis through activating Akt. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015;456(2):605–609.
629. Javed Q, Murtaza I. Therapeutic potential of tumour necrosis factor-alpha antagonists in patients with chronic heart failure. *Heart. Lung Circ.* 2013;22(5):323–327.
630. Novoyatleva T, Sajjad A, Engel FB. TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: A new player of myocardial remodeling and cardiac failure. *Front. Immunol.* 2014;5(FEB):1–10.
631. Sell H, Dietze-Schroeder D, Eckel J. The adipocyte-myocyte axis in insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* 2006;17(10):416–422.
632. Yu L, Zhao Y, Xu S, Jin C, Wang M, Fu G. Leptin confers protection against TNF- α -induced apoptosis in rat cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

- 2014;455(1–2):126–132.
633. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425–432.
 634. Karastergiou K, Mohamed-Ali V. The autocrine and paracrine roles of adipokines. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010;318(1–2):69–78.
 635. Northcott JM, Yeganeh A, Taylor CG, Zahradka P, Wigle JT. Adipokines and the cardiovascular system: mechanisms mediating health and disease. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2012;90(8):1029–59.
 636. Collins S. A heart-adipose tissue connection in the regulation of energy metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2014;10(3):157–63.
 637. Chamberland JP, Berman RL, Aronis KN, Mantzoros CS. Chemerin is expressed mainly in pancreas and liver, is regulated by energy deprivation, and lacks day/night variation in humans. *Eur. J. Endocrinol.* 2013;169(4):453–462.
 638. Gao X, Mi S, Zhang F, Gong F, Lai Y, Gao F, Zhang X, Wang L, Tao H. Association of chemerin mRNA expression in human epicardial adipose tissue with coronary atherosclerosis. *Cardiovasc. Diabetol.* 2011;10(1):87.
 639. Xiaotao L, Xiaoxia Z, Yue X, Liye W. Serum chemerin levels are associated with the presence and extent of coronary artery disease. *Coron. Artery Dis.* 2012;23(6):412–416.
 640. Orogo AM, Gustafsson ÅB. Cell death in the myocardium: My heart won't go on. *IUBMB Life*. 2013;65(8):651–656.
 641. Cittadini A, Monti MG, Iaccarino G, Castiello MC, Baldi A, Bossone E, Longobardi S, Marra AM, Petrillo V, Saldamarco L, During MJ, Saccà L, Condorelli G. SOCS1 gene transfer accelerates the transition to heart failure through the inhibition of the gp130/JAK/STAT pathway. *Cardiovasc. Res.* 2012;96(3):381–390.
 642. Cheng W-P, Wang B-W, Lo H-M, Shyu K-G. Mechanical Stretch Induces Apoptosis Regulator TRB3 in Cultured Cardiomyocytes and Volume-Overloaded Heart. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123235.
 643. Li L, Huang C, Zhang X, Wang J, Ma P, Liu Y, Xiao T, Zabel B a, Zhang J V. Chemerin-Derived Peptide C-20 Suppressed Gonadal Steroidogenesis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2014;71(3):265–277.
 644. Zhou J-X, Liao D, Zhang S, Cheng N, He H-Q, Ye RD. Chemerin C9 peptide induces receptor internalization through a clathrin-independent pathway. *Acta Pharmacol. Sin.* 2014;35(5):653–663.
 645. Xie Q, Deng Y, Huang C, Liu P, Yang Y, Shen W, Gao P. Chemerin-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *J. Cell. Mol. Med.* 2015;19(5):986–995.
 646. Li L, Ma P, Huang C, Liu Y, Zhang Y, Gao C, Xiao T, Ren P-G, Zabel BA, Zhang J V. Expression of chemerin and its receptors in rat testes and its action on testosterone secretion. *J. Endocrinol.* 2014;220(2):155–163.
 647. Foo RSY, Mani K, Kitsis RN. Death begets failure in the heart. *J. Clin. Invest.*

- 2005;115(3):565–571.
648. Benjamin IJ, Schneider MD. Learning from failure: Congestive heart failure in the postgenomic age. *J. Clin. Invest.* 2005;115(3):495–499.
 649. Ceci M, Gallo P, Santonastasi M, Grimaldi S, Latronico MVG, Pitisci a, Missol-Kolka E, Scimia MC, Catalucci D, Hilfiker-Kleiner D, Condorelli G. Cardiac-specific overexpression of E40K active Akt prevents pressure overload-induced heart failure in mice by increasing angiogenesis and reducing apoptosis. *Cell Death Differ.* 2007;14(5):1060–1062.
 650. Dhanasekaran A, Gruenloh SK, Buonaccorsi JN, Zhang R, Gross GJ, Falck JR, Patel PK, Jacobs ER, Medhora M. Multiple antiapoptotic targets of the PI3K/Akt survival pathway are activated by epoxyeicosatrienoic acids to protect cardiomyocytes from hypoxia/anoxia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008;294(2):H724–H735.
 651. Yu B, Song B. Notch 1 Signalling Inhibits Cardiomyocyte Apoptosis in Ischaemic Postconditioning. *Heart Lung Circ.* 2014;23(2):152–158.
 652. Pillai VB, Sundaresan NR, Gupta MP. Regulation of Akt signaling by sirtuins: its implication in cardiac hypertrophy and aging. *Circ. Res.* 2014;114(2):368–378.
 653. van Empel VPM, Bertrand ATA, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA, De Windt LJ. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 2005;67(1):21–29.
 654. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantzios S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J. Clin. Invest.* 2003;111(10):1497–1504.
 655. Kim JY, Xue K, Cao M, Wang Q, Liu J-Y, Leader A, Han JY, Tsang BK. Chemerin suppresses ovarian follicular development and its potential involvement in follicular arrest in rats treated chronically with dihydrotestosterone. *Endocrinology.* 2013;154(8):2912–2923.
 656. Eisinger K, Bauer S, Schäffler A, Walter R, Neumann E, Buechler C, Müller-Ladner U, Frommer KW. Chemerin induces CCL2 and TLR4 in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Exp. Mol. Pathol.* 2012;92(1):90–96.
 657. Yang H, Li F, Kong X, Yuan X, Wang W, Huang R, Li T, Geng M, Wu G, Yin Y. Chemerin regulates proliferation and differentiation of myoblast cells via ERK1/2 and mTOR signaling pathways. *Cytokine.* 2012;60(3):646–652.
 658. Sussman M a, Völkers M, Fischer K, Bailey B, Cottage CT, Din S, Gude N, Avitabile D, Alvarez R, Sundararaman B, Quijada P, Mason M, Konstandin MH, Malhowski A, Cheng Z, et al. Myocardial AKT: the omnipresent nexus. *Physiol. Rev.* 2011;91(3):1023–1070.
 659. Wood TE, Dalili S, Simpson CD, Hurren R, Mao X, Saiz FS, Gronda M, Eberhard Y, Minden MD, Bilan PJ, Klip A, Batey RA, Schimmer AD. A novel inhibitor of glucose uptake sensitizes cells to FAS-induced cell death. *Mol. Cancer Ther.* 2008;7(11):3546–3555.
 660. Rim H-K, Cho S, Shin D-H, Chung K-S, Cho Y-W, Choi J-H, Lee JY, Lee K-T. T-

- type Ca^{2+} channel blocker, KYS05090 induces autophagy and apoptosis in A549 cells through inhibiting glucose uptake. *Molecules*. 2014;19(7):9864–9875.
661. Berg V, Sveinbjörnsson B, Bendiksen S, Brox J, Meknas K, Figenschau Y. Human articular chondrocytes express ChemR23 and chemerin; ChemR23 promotes inflammatory signalling upon binding the ligand chemerin(21-157). *Arthritis Res. Ther.* 2010;12(6):R228.
 662. Lambernd S, Taube A, Schober A, Platzbecker B, Görgens SW, Schlich R, Jeruschke K, Weiss J, Eckardt K, Eckel J. Contractile activity of human skeletal muscle cells prevents insulin resistance by inhibiting pro-inflammatory signalling pathways. *Diabetologia*. 2012;55(4):1128–1139.
 663. Hill MM, Andjelkovic M, Brazil DP, Ferrari S, Fabbro D, Hemmings B a. Insulin-stimulated protein kinase B phosphorylation on Ser-473 is independent of its activity and occurs through a staurosporine-insensitive kinase. *J. Biol. Chem.* 2001;276(28):25643–25646.
 664. Yu H, Che X, Xu X, Zheng M, Zhao Y, He W, Yu J, Xiong J, Li W. Insulin protects apoptotic cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury through the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate axis. *PLoS One*. 2013;8(12):e80644.
 665. Bauer S, Bala M, Kopp A, Eisinger K, Schmid A, Schneider S, Neumeier M, Buechler C. Adipocyte chemerin release is induced by insulin without being translated to higher levels in vivo. *Eur. J. Clin. Invest.* 2012;42(11):1213–1220.
 666. Wang Q-L, Zhao L, Feng N, Zhou P, Wu Q, Fan R, Li J, Zhang S-M, Wang Y-M, Xu X-Z, Yu S-Q, Yi D-H, Pei J-M. Lacidipine attenuates $\text{TNF-}\alpha$ -induced cardiomyocyte apoptosis. *Cytokine*. 2014;71(1):60–65.





ANEXO

Vínculos a los artículos publicados que contienen datos de esta tesis doctoral:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295211003340>

<https://www.karger.com/Article/FullText/430343>



